

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

STUDIJNÍ PROGRAM: BIOLOGIE (NAVAZUJÍCÍ MAGISTERSKÉ STUDIUM; N1501)

STUDIJNÍ OBOR: BOTANIKA (NBOTA; 1507T004)



BC. EVA KONDRYSOVÁ

O HYBRIDNÍM PŮVODU *CHENOPODIUM ALBUM*

ON THE ORIGIN OF *CHENOPODIUM ALBUM* BY MEANS OF HYBRIDIZATION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

VEDOUCÍ ZÁVĚREČNÉ PRÁCE: DOC. MGR. BOHUMIL MANDÁK, PHD.

PRAHA, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze: 29. 4. 2015

.....
podpis

ABSTRAKT

Práce se zabývá genetickou variabilitou a evolučními vztahy mezi vybranými druhy skupiny *Chenopodium album* a původem hexaploidního druhu *Ch. album*. Hlavní otázkou této studie bylo, zda na území České republiky dochází k recentnímu vzniku *Ch. album* s. str. ve smíšených populacích pěti druhů, reprezentovaných na diploidní úrovni druhy *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum*, na tetraploidní úrovni *Ch. strictum* a *Ch. striatiforme* a na hexaploidní úrovni druhem *Ch. album*. K zodpovězení těchto otázek byly použity mikrosatelitové markery, které jsou pro odhalení rodičovských linií vhodné. Jelikož pro danou skupinu nebyly vyvinuty žádné mikrosatelitové primery, bylo nutné si je na počátku studia vyvinout a to přenosem z blízké příbuzného druhu *Ch. quinoa*.

Přenosem mikrosatelitových primerů se podařilo sestavit tři multiplex PCR, které byly testovány na reprezentativním vzorku, na kterém byla odhadnuta genetická variabilita mikrosatelitových lokusů. Pomocí optimalizovaných mikrosatelitových markerů bylo analyzováno celkem 911 jedinců nasbíraných z pěti lokalit v České republice. Výsledky analýz ukázaly na (1) vysokou mezidruhovou diferenciaci, (2) genový tok mezi druhy stejných ploidních úrovní, (3) přítomnost kříženců jak mezi diploidními druhy *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum*, tak i mezi tetraploidními druhy *Ch. strictum* a *Ch. striatiforme*. Zvláště zajímavý byl objev kříženců mezi tetraploidními druhy, jelikož se jedná vůbec o první důkaz, že mezi těmito druhy k hybridizaci dochází.

Potvrdila se již dříve prezentovaná hypotéza o alopolyloidním původu hexaploidního druhu *Ch. album* z diploidního a tetraploidního druhu. Výsledky analýz ukázaly, že k recentnímu vzniku *Ch. album* s. str. může velmi vzácně docházet, jelikož bylo detekováno 8 jedinců, kteří jsou pravděpodobně recentními kříženci mezi diploidními a tetraploidními druhy. Analýzou však nebylo možné určit přesného diploidního rodiče, ale na tetraploidní úrovni se jako pravděpodobný rodič ukázal *Ch. striatiforme*.

Klíčová slova: *Chenopodium*, mikrosatelity, hybridizace, genetická struktura

ABSTRACT

Diploma thesis deals with genetic variability and evolutionary relationships among selected species of the group *Chenopodium album* and is especially focused on the origin of hexaploid species *C. album* in the Czech Republic. The main aim of the study was detection of putative recent emergence of hexaploid *C. album* s. str. in mixed populations of diploid (*C. ficifolium* and *C. suecicum*) and tetraploid (*C. strictum* and *C. striatiforme*) species. To assess phylogenetical relationships I performed an analysis of nuclear microsatellite loci, that are suitable for detection parental lines within polyploid species. As long as microsatellite primers have been developed for studied group, therefore they had to be cross-amplified from closely related species *C. quinoa*.

Three PCR multiplexes were assembled by cross-amplification of microsatellite primers. These PCR multiplexes were tested on representative sample sets to estimate genetic variability of individual microsatellite loci. A total of 911 individuals were analyzed from five localities from the Czech Republic. The results of analyses revealed (1) high interspecific differentiation, (2) gene flow among species of the same ploidy levels, (3) presence of hybrids among diploid species of *C. ficifolium* and *C. suecicum* as well as among tetraploid species *C. strictum* and *C. striatiforme*. Discovery of hybrids among tetraploid species was considered the most interesting since it is the first evidence hybridization among these species ever.

Previously presented hypothesis about allopolyploid origin of hexaploid species *C. album* from diploid and tetraploid species has been confirmed. The results of analyses have shown that *C. album* has arisen by hybridization between a diploid and a tetraploid species recently. Recent hybridization can occur very rarely as only eight recent hybrid individuals were detected. Exact diploid parental species could not be determined by analysis, but *C. striatiforme* has been detected as putative parental tetraploid species.

Keywords: *Chenopodium*, microsatellites, hybridization, genetic structure

Poděkování

Poděkování patří mému školiteli Bohoušovi Mandákovi za odborné vedení diplomové práce a také všem zaměstnancům Oddělení genetické ekologie Botanického ústavu v Průhonicích, kteří mi pomáhali při práci v molekulární laboratoři.

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
1.1	OTÁZKY A CÍLE.....	10
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	11
2.1	MEZIDRUHOVÁ HYBRIDIZACE.....	11
2.1.1	Typy hybridní speciace.....	12
2.2	POLYPLOIDIE JAKO EVOLUČNÍ FENOMÉN.....	13
2.2.1	Polyplodie.....	13
2.2.2	Klasifikace polyplodů.....	13
2.2.3	Vznik polyplodních jedinců.....	14
2.2.4	Důsledky polyplodizace.....	15
2.2.5	Genový tok mezi odlišnými ploidiemi.....	15
2.3	POSTAVENÍ MIKROSATELITŮ V POPULAČNÍ GENETICE.....	16
2.3.1	Obecná charakteristika mikrosatelitů.....	16
2.3.2	Výhody a omezení analýzy mikrosatelitů.....	17
2.3.3	Distribuce a potenciální funkce v genomu.....	18
2.3.4	Využití mikrosatelitů v populační genetice.....	18
2.3.5	Přenos existujících mikrosatelitových primerů – Popis použité metody.....	19
2.3.6	Vyhodnocování primárních mikrosatelitových dat.....	20
2.3.7	Vyhodnocování mikrosatelitových dat u polyplodních druhů.....	21
2.4	TAXONOMICKÉ VYMEZENÍ RODU <i>CHENOPODIUM</i> V SYSTÉMU CÉVNATÝCH ROSTLIN.....	22
2.4.1	Vývoj čeledi <i>Amaranthaceae</i> Juss.....	22
2.4.2	Vývoj podčeledi <i>Chenopodioideae</i> (<i>Amaranthaceae</i>).....	22
2.4.3	Klasifikace rodu <i>Chenopodium</i>	22
2.4.4	Pozice skupiny <i>Chenopodium album</i>	23
2.5	ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA STUDOVANÉ SKUPINY.....	26
2.5.1	Charakteristika čeledi <i>Amaranthaceae</i>	26
2.5.2	Základní charakteristika skupiny <i>Chenopodium album</i>	26
2.6	CHARAKTERISTIKA STUDOVANÝCH DRUHŮ.....	27
2.6.1	<i>Chenopodium ficifolium</i> Sm. – merlík fíkolistý.....	27
2.6.2	<i>Chenopodium suecicum</i> Murr – merlík švédský.....	28
2.6.3	<i>Chenopodium strictum</i> Roth – merlík tuhý.....	28
2.6.4	<i>Chenopodium striatiforme</i> Murr – merlík drobnolistý.....	29
2.6.5	<i>Chenopodium album</i> L. s. str. – merlík bílý.....	30
2.7	HYBRIDIZACE A ROLE POLYPLOIDIE VE SKUPINĚ <i>CHENOPODIUM ALBUM</i>	31
2.7.1	Mezidruhová hybridizace rodu <i>Chenopodium</i>	31
2.7.2	Původ polyplodních druhů skupiny <i>Chenopodium album</i>	32
3	METODIKA.....	34
3.1	VZORKY POUŽITÉ NA TESTOVÁNÍ VARIABILITY MIKROSATELITOVÝCH MARKERŮ.....	34
3.2	VZORKY POUŽITÉ NA ANALÝZY ODHADU TOKU GENŮ MEZI STUDOVANÝMI DRUHY.....	37
3.3	IZOLACE DNA.....	39
3.3.1	Měření koncentrace a testování kvality DNA.....	39
3.4	TESTOVÁNÍ MIKROSATELITOVÝCH PRIMERŮ A MULTIPLEX PCR.....	41
3.4.1	Cross-amplifikace a optimalizace PCR.....	41
3.4.2	Optimalizace multiplex PCR a implementace na analýzy.....	45
3.5	HODNOCENÍ MIKROSATELITOVÝCH DAT.....	46
3.5.1	Odhad genetické variability mikrosatelitů.....	47
3.5.2	PCoA (analýza hlavních koordinát).....	48

3.5.3	Tvorba fylogenetického stromu	48
3.5.4	STRUCTURE (určení genetické struktury populací)	49
4	VÝSLEDKY	51
4.1	CROSS-AMPLIFIKACE A GENETICKÁ VARIABILITA MIKROSATELITŮ	51
4.1.1	Cross-amplifikace a multiplex PCR	51
4.1.2	Genetická variabilita a diverzita cross-amplifikovaných mikrosatelitů	52
4.2	GENETICKÁ DIVERZITA STUDOVANÝCH DRUHŮ NA 5 VYBRANÝCH LOKALITÁCH	56
4.2.1	Genetická diverzita mezi lokalitami	60
4.3	GENETICKÁ STRUKTURA POPULACÍ	62
4.3.1	O původu <i>Chenopodium album</i>	62
4.3.2	Genetická struktura druhů stejné ploidní úrovně	65
4.3.3	Genetická struktura populací na 5 lokalitách	71
4.4	ANALÝZA HLAVNÍCH KOORDINÁT (PCoA)	74
4.4.1	Analýza hlavních koordinát pro jednotlivé lokality	76
4.5	FYLOGENETICKÝ STROM VYTVOŘENÝ METODOU <i>NEIGHBOUR-JOINING</i>	82
5	DISKUSE	84
5.1	CROSS-AMPLIFIKACE A GENETICKÁ VARIABILITA MIKROSATELITŮ	84
5.2	GENETICKÁ DIVERZITA STUDOVANÝCH DRUHŮ	85
5.3	HOMOPLOIDNÍ HYBRIDIZACE V RÁMCI STUDOVANÝCH DRUHŮ	87
5.4	O PŮVODU <i>CHENOPODIUM ALBUM</i>	88
6	ZÁVĚR	91
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	92
8	SEZNAM PŘÍLOH	103
9	PŘÍLOHY	104

1 Úvod

V posledních několika letech se povědomí o mezidruhově hybridizaci a polyploidizaci značně rozšířilo a stalo se námětem mnoha vědeckých studií. Polyploidizace je jedním z klíčových faktorů v adaptaci na nové či extrémní podmínky. To potvrzuje názor, že se jedná o silný evoluční mechanismus. Recentní studie ukazují, že více než 70 % všech krytosemenných rostlin prodělalo ve své historii minimálně jednu polyploidizační událost. Studium těchto procesů, často vedoucí k druhové speciaci a odhalení rodičovských linií vzniklých polyploidů, je klíčové k porozumění evolučních vztahů mezi jednotlivými taxony (Abbott et al. 2013; Ramsey and Schemske 1998; Soltis et al. 2009a).

Mezidruhovou hybridizací a následnou polyploidizací může vzniknout nový druh tzv. alopolyploid, který oproti svým předkům může získat nové vlastnosti vedoucí k vyšší úspěšnosti přežití či vylepšení stávajících vlastností. Mnoho ekonomicky významných druhů je alopolyploidního původu, což staví tuto problematiku do středu zájmu (Adams and Wendel 2004; Lim et al. 2004). Do této skupiny rostlin můžeme zahrnout rod *Chenopodium* L., který má celosvětové rozšíření a je zastoupen přibližně 160 druhy (APG III 2009). Známý jsou ale především druhy, které jsou využívány v potravinářském průmyslu a medicíně jako např. *Ch. quinoa* Willd., *Ch. ambrosioides* L. či *Ch. berlandieri* Moq. subsp. *nuttalliae* (Saff.) Wilson & Heiser (Bhargava et al. 2006).

Tato práce se zabývá vybranými zástupci skupiny *Chenopodium album* L., který představuje diploidně-polyploidní komplex druhů, rozšířených převážně v temperátním pásu celého světa (Aellen and Just 1943; Aellen 1960). Řadí se mezi nejobtížnější plevelné rostlinné druhy s nejasným původem, pravděpodobně ze střední Asie. Jednotlivé druhy jsou však od sebe často obtížně odlišitelné a z taxonomického hlediska představují kritickou skupinu, za jejíž variabilitou stojí či mohou stát následující faktory: (1) Vysoká míra hybridizace mezi jednotlivými taxony, (2) přítomnost několika ploidních úrovní, (3) vysoká míra samosprašnosti jednotlivých druhů a (4) značná fenotypová plasticita v rámci druhů. Co se týče ploidie, nalézáme zde diploidní, tetraploidní a hexaploidní druhy, které mohou hypoteticky vznikat více způsoby. Nejpravděpodobnějším způsobem vzniku hexaploidního druhu *Ch. album*, který je středem zájmu této práce, je hybridizace mezi diploidními a tetraploidními druhy. Bohužel je velmi obtížné rozpoznat, které diploidní a tetraploidní druhy se podílely na vzniku *Ch. album*, zejména z důvodu použití nedostatečně „jemného“ genetického markeru (Mandák et al. 2012). Z toho plynou

rozporuplné výsledky studií zabývající se touto problematikou a prakticky žádné informace o původu a evoluci jednotlivých druhů (Gangopadhyay et al. 2002; Mandák et al. 2012; Rahiminejad and Gornall 2004).

Při určování původu hexaploidního *Ch. album* s. str. jsou brány v úvahu 3 možné hypotézy vzniku: (1) Ke vzniku jednotlivých druhů došlo v dávné minulosti a v současné době k jejich hybridizaci nedochází, tudíž na lokalitách společného výskytu tzv. neopolyploidi nevznikají. (2) Opačná situace může nastat, když opakovanou hybridizací a polyploidizací se na lokalitách neopolyploidní druhy vyskytovat budou. (3) Poslední možnou variantou je současný výskyt jak dávných kříženců, tak jedinců, kteří vznikají recentně. Předpokládám, že jednotlivé druhy mají různou genetickou variabilitu díky výskytu odlišných ploidii, způsobu rozmnožování a historii zavlečení do prostoru střední Evropy. Testováním druhů z geograficky odlišných území budu schopna tyto hypotézy potvrdit či vyvrátit.

Prvotním cílem diplomové práce je odhad genetické variability a mezipopulačního toku genů mezi pěti vybranými druhy skupiny *Chenopodium album* na území Evropy, která bude zjištěna pomocí mikrosatelitových markerů (Jarne and Lagoda 1996). Vzhledem k tomu, že doposud nejsou publikovány žádné mikrosatelitové markery specificky vyvinuté pro tuto skupinu, je prvním krokem diplomové práce jejich vývoj, který je proveden přenosem mikrosatelitových markerů z příbuzného, ekonomicky významného jihoamerického druhu *Ch. quinoa* (Jacobsen 2011) a následně jejich testování na reprezentativním vzorku zástupců skupiny *Ch. album* vybraných z dostatečně vzdálených populací. Na diploidní úrovni jsou testovány *Ch. ficifolium* Sm. a *Ch. suecicum* Murr, na tetraploidní úrovni *Ch. strictum* Roth a *Ch. striatiforme* Murr a na hexaploidní úrovni *Ch. album* s. str. Stěžejní část práce se zabývá původem a možnostmi odhalení recentního vzniku hexaploidního druhu *Ch. album* s. str. ve smíšených populacích uvedených druhů rostoucích na společných lokalitách České republiky. S jistotou víme, že *Chenopodium album* s. str. je alohexaploid vznikající křížením diploidního a tetraploidního druhu (Mandák et al. 2012; Rahiminejad and Gornall 2004). Bez použití dostatečně variabilních genetických markerů je však velmi obtížně určitelné, které druhy se podílely na této hybridizaci. Z tohoto důvodu byl na analýzy zvolen mikrosatelitový genetický marker, který je obvykle velmi polymorfní a tudíž je vhodným nástrojem na zodpovězení kladených otázek.

1.1 OTÁZKY A CÍLE

- 1) Přenos a sestavení funkčního setu mikrosatelitových markerů z blízce příbuzného druhu *Chenopodium quinoa* pro 5 studovaných druhů skupiny *Chenopodium album*.
- 2) Odhad genetické diverzity pěti studovaných druhů skupiny *Chenopodium album* na území Evropy.
- 3) Dochází na území ČR mezi studovanými druhy stejných ploidních úrovní k mezidruhové hybridizaci?
- 4) Dochází na území ČR k recentnímu vzniku *Chenopodium album* s. str. na vybraných lokalitách společného výskytu studovaných druhů?

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 MEZIDRUHOVÁ HYBRIDIZACE

Hybridizace u rostlin je obecně vnímána jako potenciální zdroj variability, která často vede, spolu s duplikací celého genomu, k rychlému vzniku nových druhů (Mallet 2007; Soltis and Soltis 2009). Nový hybridogenní druh může vzniknout, pokud se 2 existující druhy kříží a produkují životaschopné potomstvo, které je reprodukčně odděleno od svých rodičů. Rekombinací rodičovských genomů pak vznikají nové alelické kombinace, které se mohou projevovat jak na molekulární, tak na morfologické úrovni (Abbott et al. 2013; Rieseberg and Willis 2007).

Úspěšnému vzniku nového rostlinného křížence často brání ať už prezygotické či postzygotické reprodukční bariéry. Přestože se některé druhy mohou křížit, jejich hybridní F1 generace je často díky genetické nekompatibilitě rodičovských genomů neživotaschopná či sterilní. Doklady o úspěšné hybridní speciaci jsou tedy poměrně vzácné, protože takto vznikající hybridní jedinci, přestože jsou do určité míry fertilní, nejsou obvykle dobře adaptováni na stanoviště rodičovských taxonů, a navíc od nich bývají pouze slabě reprodukčně izolováni. Z toho plyne, že se mnohdy mohou s rodičovskými druhy zpětně křížit a vytvářejí spíše sérii přechodů mezi nimi, než samostatnou biologickou jednotku, nezávislou na svých rodičích (Mallet 2008).

Blízce příbuzné druhy mají tendenci ke společné hybridizaci častěji, ovšem větší evoluční potenciál mají kříženci vzniklí z jedinců s více odlišnými genomy (Abbott and Lowe 2004). Vývoj úplné reprodukční izolace může probíhat velmi rychle či trvat stovky až miliony generací. Během této doby mohou populace měnit svoji velikost, rozmístění v prostoru či se adaptovat na klimatické změny. Analýza hybridních rojů a mladých hybridních taxonů může hrát důležitou roli při objasnění vzniku těchto hybridních druhů (Arnold et al. 1999; Rieseberg 1997).

2.1.1 TYPY HYBRIDNÍ SPECIACE

Rozlišují se dva typy hybridní speciace: (1) Homoploidní hybridní speciace, která nezahrnuje duplikaci genomu, tedy polyploidizaci. Po dlouhou dobu byl tento proces považován za velmi vzácný, zejména však proto, že je velmi obtížné takovéto hybridy v přírodě odhalit. Homoploidní hybridní druh je od rodičovské linie obvykle málo reprodukčně izolovaný a je od nich těžko rozpoznatelný, jelikož kombinuje oba rodičovské genomy. Homoploidní hybrid vzniká izolací od rodičovských druhů, a to buď pomocí vnější geografické a ekologické bariéry, nebo důsledkem vnitřní genetické bariéry. Nový hybrid může vzniknout velmi rychle, ovšem obvykle trvá dlouhou dobu, než se geneticky i fenotypově v prostředí stabilizuje (Abbott et al. 2010). Nejlépe zdokumentovaný vznik homoploidních diploidních hybridů představují druhy rodu slunečnice *Helianthus* *anomalus* S. F. Blake, *H. deserticola* Heiser a *H. paradoxus* Heiser, vznikající křížením *H. annuus* L. ($2n = 2x = 34$) a *H. petiolaris* Nutt. ($2n = 2x = 34$). Tyto hybridní druhy vznikly nezávisle na sobě z uvedených rodičovských druhů přibližně před 60 000–200 000 roky (Rieseberg et al. 2003). Dalším nedávno vzniklým homoploidním hybridem je *Senecio squalidus* L., obývajícím hybridní zónu mezi rodičovskými druhy *S. aethnensis* Jan ex DC. ($2n = 2x = 20$) a *S. chrysanthemifolius* DC. ($2n = 2x = 20$; James and Abbott 2005).

(2) Alopolyloidní speciace, při které po hybridizační události dochází ke znásobení genomu, je v přírodě poměrně častá. Tento mechanismus vede k tvorbě silné, i když často neúplné, postzygotické reprodukční bariéry mezi hybridem a jeho rodiči. Alopolyloidní jedinci jsou často schopni lépe osidlovat nová prostředí, která mohou být pro jejich diploidní předky nevhodná. Příkladem spontánně vzniklého alopolyloidního hybrida může být *Spartina anglica* C. E. Hubb. ($2n = 12x = 120, 122, 124$), který vznikl během konce 19. století v Anglii, zkřížením domácího druhu *S. alterniflora* Loisel. ($2n = 6x = 60, 62$) a introdukovaného druhu *S. maritima* Fernald ($2n = 6x = 60$). Prostřednictvím sterilního F1 hybrida *Spartina* × *townsendii* H. Groves & J. Groves ($2n = 6x = 60, 62$) vznikl genomovou duplikací fertilní druh *S. anglica*, který byl schopen rychle kolonizovat prostředí v oblasti vzniku a poté se rozšířit i na další kontinenty (Ainouche et al. 2004; Chelaifa et al. 2010).

2.2 POLYPLOIDIE JAKO EVOLUČNÍ FENOMÉN

2.2.1 POLYPLOIDIE

Buněčná jádra s jednou sadou chromozomů se označují jako monoploidní, s dvěma sadami jako diploidní, přičemž 3 a více chromosomových sad jsou označovány jako polyploidní. Současné studie ukazují, že 30–70 % krytosemenných rostlin prošlo minimálně jednou polyploidizační událostí celého genomu (duplikací celého genomu = *whole genome duplication*; Jaillon et al. 2009). Polyploidie hraje významnou roli v evoluci nejen rostlin, ale i hub a živočichů (Adams and Wendel 2005; Mable 2004; Soltis et al. 2014).

2.2.2 KLASIFIKACE POLYPLOIDŮ

Klasický přístup dělí polyploidy na autopolyploidy a alopolyploidy. Autopolyploidie je prosté zdvojení homologních chromosomových sad ($AA + AA \rightarrow AAAA$) v rámci jednoho druhu. V průběhu meióze se obvykle tvoří multivalentní páry chromosomů, čímž je také často vysvětlována snížená fertilita autopolyploidů. Oproti tomu, k alopolyploidii dochází po mezidruhovém křížení, duplikací nehomologních chromosomových sad ($AA + BB \rightarrow AB \rightarrow AABB$). V průběhu meióze alopolyploidi vytvářejí bivalentní páry chromosomů, což vede k tomu, že jsou plně plodní (Ramsey and Schemske 1998; Stebbins 1947). Při klasifikaci polyploidů se ještě můžeme setkat s pojmem segmentární polyploid, kdy se některé chromosomy párují v bivalentech a jiné v multivalentech. Typickým představitelem tohoto jevu je rod *Tragopogon* L. (Ownbey 1950).

Druhé nejčastěji uváděné dělení reflektuje stáří polyploidů. U paleopolyploidů (tj. u polyploidů, u nichž nastala polyploidizační událost před mnoha miliony let) obvykle nenacházíme diploidní předky (Van de Peer et al. 2009), zatímco u neopolyploidů (tj. nedávno vzniklých polyploidů) můžeme najít jak diploidní taxony, tak jejich polyploidní deriváty (Abbott and Lowe 2004). Někdy je popisován typ přechodný, tzv. mezopolyploid, u něhož můžeme najít diploidní zástupce na vyšší taxonomické úrovni. Příkladem mezopolyploida mohou být zástupci některých skupin z čeledi *Brassicaceae* např. *Brassica napus* L. či *Arabidopsis suecica* (Fr.) Norrl. ex O. E. Schulz (Bennett 2004; Mandáková et al. 2010).

2.2.3 VZNIK POLYPLOIDNÍCH JEDINCŮ

Existuje několik základních mechanismů, které se uplatňují při vzniku polyploidních jedinců (Soltis et al. 2010). (1) Nejčastější způsob vzniku polyploidních buněk je somatická polyploidizace, tj. spontánní zdvojení chromosomových sad v somatických buňkách. Ta nastává buď přímo, např. v buňkách meristému, xylému, antipodách či endospermu tzv. endoreduplikací, nebo tento stav lze uměle navodit mitotickými jedy (např. kolchicin, oryzalin; Chen et al. 2004). (2) Gametická polyploidizace, kdy polyploidní buňky vznikají duplikací pohlavních buněk.

Někteří polyploidní jedinci mohou vznikat splynutím neredukovaných gamet, které se tvoří při meiotických poruchách. Neredukované gamety jsou produkovány ve vyšší míře, než se původně předpokládalo (Brownfield and Köhler 2011; Ramsey 2007), s tím, že jejich tvorba je indukována stresem (poranění, mráz, obsah živin v půdě, herbivorie). Přestože neredukované gamety mohou vznikat, jejich frekvence výskytu je výrazně nižší v porovnání s redukovanými gametami. Vzhledem k jejich nízké frekvenci výskytu, vzniká pravděpodobně mnoho polyploidů v důsledku splývání jedné redukované (n) a jedné neredukované ($2n$) gamety přes tzv. triploidní most. Tito triploidní hybridy mají ovšem často sníženou fertilitu a životaschopnost (Köhler et al. 2010). Polyploidizace je pak cestou k obnovení jejich plodnosti. Rozpoznat polyploidní druh může být v mnoha případech obtížné, zejména pak pokud k polyploidizační události došlo v dávné minulosti. V takových případech se polyploidní druh může z genetického hlediska chovat jako diploid. Tento proces označovaný jako diploidizace probíhá v důsledku postupné homogenizace a umlčování genů. Příkladem tohoto jevu je druh *Zea mays* L. ($2n = 2x = 20$), který byl dlouho považován za diploidní taxon a až nové výzkumy ukázaly, že se jedná o alopolyploida (Swigonova et al. 2004). Naprostá většina polyploidů také vzniká v přírodě opakovaně (tzv. polytopní vznik), čímž je generována variabilita na morfologické i genetické úrovni (Lipman et al. 2013; Soltis et al. 2009b; Zozomová-Lihová et al. 2014).

I přes úspěšný vznik fertilního polyploida, je polyploidní jedinec v přirozených podmínkách vystaven selekčnímu tlaku okolí, zejména pak ze strany konkurence se svými diploidními předky. Dalším problémem je nalezení vhodného kompatibilního sexuálního partnera pro následné rozmnožování. Tento problém je znám jako *minority cytotype exclusion*, kdy je jedinec z populace časem vyloučen díky menšinovému zastoupení jeho cytotypu (Levin 1975). Některé z těchto faktorů, které jedinci sťažují přežití, může překonat např. kolonizací nového stanoviště, vyšší zdatností oproti svým předkům

či změnou reprodukčního systému. Mnoho polyploidů je samosprašných nebo apomiktických, což umožňuje reprodukci bez nutnosti sexuálního partnera (Mallet 2007).

2.2.4 DŮSLEDKY POLYPLOIDIZACE

Význam polyploidie v rostlinné říši je velmi důležitou ekologickou otázkou. Důležitým objevem byla rychlost a dynamičnost restrukturalizace polyploidních genomů, spojená s jeho zvětšením či možnou změnou funkcí genů. Procesem polyploidizace se také zvyšuje množství kopií jednotlivých genů, které mohou mutovat a v některých případech i získávat nové funkce. Opakovanou polyploidizací geneticky odlišných jedinců se mohou tvořit rozdílné polyploidní populace a vytvářet nové genotypy. Modelovým příkladem tohoto jevu je *Tragopogon miscellus* Ownbey ($2n = 4x = 24$) a *T. mirus* Ownbey ($2n = 4x = 24$), dva alopolyploidní „druhy“, kterým se přičítá více než 21 násobný vznik (Lipman et al. 2013; Soltis et al. 2009b).

Úspěšnost polyploidních rostlin je dána hlavně širokou škálou stanovišť, která obývají oproti svým diploidním předkům. Vysvětlením je (1) velká plasticita polyploidních druhů a (2) existence lokálně adaptovaných typů polyploidů. I když je vyšší plasticita u vyšších ploidních úrovní obecně známa, nemusí to být vždy pravda. Martin a Husband (2009) porovnávali v Severní Americe diploidní a polyploidní druhy a neshledali mezi nimi žádné rozdíly v preferenci stanoviště v rámci zeměpisné šířky a klimatických podmínek. Diploidi a polyploidi se také mohou lišit v rezistenci proti patogenům. Oswald a Nuismer (2007) zkoumali pomocí matematických modelů možnost, že nově vzniklí polyploidi jsou zpočátku odolnější vůči patogenům než jejich diploidní předci, přičemž tuto hypotézu potvrdili. Dále se také mění produkce hormonů v polyploidních buňkách či tito jedinci mají delší délku života a semena těchto rostlin jsou větší. Zajímavé také je, že alopolyploidi mají větší tendenci k samosprašení, než autopolyploidní jedinci (Tayalé and Parisod 2013).

2.2.5 GENOVÝ TOK MEZI ODLIŠNÝMI PLOIDIEMI

Reprodukční izolace mezi ploidními úrovněmi je často předpokladem ke vzniku nového druhu. Nicméně existují cesty, které zajišťují tok genů mezi jedinci odlišných ploidii (Chapman and Abbott 2010). Jedna z možností je přes triploidní hybridy, kteří mohou produkovat polyploidní potomstvo, poté co dojde ke splnutí neredukované gamety triploidního jedince s redukovanou gametou diploidního předka. Ve volné přírodě ale často

vzniká tzv. triploidní blok, kdy se triploidní jedinci netvoří nebo bývají často sterilní či neživotascopní (Husband 2004). Henry et al. (2005) zkoumali vliv triploidie u *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ($2n = 10$), přičemž triploidní jedinci byli plodní a schopní tvořit polyploidní potomstvo a fungují jako most mezi ploidiemi. Další možností je přímý genový tok mezi ploidiemi splynutím neredukovaných gamet. Tento způsob byl zjištěn např. mezi diploidním *Sorghum bicolor* (L.) Moench ($2n = 2x = 20$) a tetraploidním *S. halepense* Pers. ($2n = 4x = 40$; Arriola and Ellstrand 1996). Tento způsob vzniku hexaploidního jedince je ovšem v přirozeném prostředí spíše vzácný.

Častěji je známa v přirozeném prostředí absence genového toku mezi ploidiemi. Münzbergová et al. (2013) studovali vztahy na třech prostorových úrovních mezi diploidními a hexaploidními jedinci skupiny *Aster amellus* L. Pomocí mikrosatelitových markerů zjistili, že na kontaktních zónách obou cytotypů k výměně genetického materiálu nedochází.

2.3 POSTAVENÍ MIKROSATELITŮ V POPULAČNÍ GENETICE

Rychlý rozvoj nových molekulárních metod nabízí celou řadu možností, kterými můžeme hledat odpovědi na fylogenetické, biosystematické či dokonce ekologické otázky, které dříve nebylo možné zodpovědět (Semagn et al. 2006).

2.3.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA MIKROSATELITŮ

Mikrosatelity, známé také pod názvy *simple sequence repeats* (SSRs), *short tandem repeats* (STRs), *variable number tandem repeat* (VNTR), jsou jedny z nejvariabilnějších genetických markerů (Jarne and Lagoda 1996). Mikrosatelity jsou repetitivní (tandemové) DNA sekvence, které jsou obvykle 2–6 bp (párů bází) dlouhé. Jednotlivé alely jsou dané různým počtem opakování těchto repetit. Nachází se v jaderném, chloroplastovém a mitochondriálním genomu prokaryotních i eukaryotních organismů. U rostlin je v populační genetice nejvíce používaným motivem repetice dinukleotidové AT báze. Mononukleotidové repetice se v populační genetice používají velmi omezeně, jelikož se hůře amplifikují při PCR reakci. Existují i trinukleotidové či tetranukleotidové repetitivní sekvence, které jsou v rostlinném genomu méně časté (Ellegren 2004).

Díky vysoké mutační rychlosti, obvykle se pohybující v rozmezí 10^{-2} – 10^{-6} na lokus/generaci, se generuje značná alelická variabilita. Tato variabilita, tzn. změna počtu opakování repetit, může vznikat tzv. „sklouznutím” (*slippage*) DNA polymerázy při

duplikaci genomické DNA v průběhu buněčného dělení či při nerovnoměrném (*unequal*) crossing overu (tj. typ chromozomálního překřížení, kdy nedojde k přesnému spárování chromozomů při meióze, přičemž dojde k záměně sekvencí z různých míst na chromozomu). Četnost mutací roste se zvyšujícím se počtem repetitivních mikrosatelitů či rekombinací při buněčném dělení (Schlötterer 2000). Pro vysvětlení mutační dynamiky bylo navrženo několik modelů (Calabrese et al. 2001), kdy se nejčastěji bere v úvahu zisk či ztráta jedné repetitivní jednotky tzv. *stepwise mutation model* (Kimura and Ohta 1978).

Rozlišují se různé typy mikrosatelitů: (1) Jednoduché (*simple*) mikrosatelity složené z jednoho motivu, který se opakuje – např. ATATATAT, (2) složené (*compound*) kde je více repetitivních motivů – např. ATATGCGC a (3) přerušované (*interrupted*), kdy se mezi opakující se báze vmezeřují jiné, např. CACATTCACA (Urquhart et al. 1994).

2.3.2 VÝHODY A OMEZENÍ ANALÝZY MIKROSATELITŮ

Přednosti této metody spočívají v hojném zastoupení mikrosatelitů napříč celým genomem, které jsou součástí kódujících (*exon*) i nekódujících (*intron*) oblastí, dále vysokým polymorfismem jednotlivých lokusů, kodominantním charakterem a poměrně snadnou analýzou, která je v současné době stále více finančně dostupná. Další nespornou výhodou je fakt, že na analýzu není potřeba velké množství DNA, která nemusí být izolována z čerstvého materiálu a může být při správném uložení použita i za několik let (Li et al. 2002). Jejich specifická jim předurčuje velmi malou pravděpodobnost kontaminace jinou DNA při zpracování vzorků, s jakou se například potýká metoda AFLP (Vos et al. 1995).

Omezení jejich využití vyplývají převážně z jejich specifických. K tomu, abychom mohli používat mikrosatelity, potřebujeme pro každý studovaný druh znát specifické mikrosatelitové primery, tj. krátké sekvence ohraničující samotný mikrosatelit (tzv. *flanking region*). Nevýhodou může být i již zmíněná vysoká mutační rychlost. Další nevýhodou může být odlišný původ alel, jelikož dvě stejně dlouhé alely mohou mít odlišnou historii vzniku. Rozlišujeme alely, které mají stejný původ tzv. *identical by descent* od alel, které se jeví jako stejné, ale vznikly odlišným způsobem tzv. *identical by state* (Li et al. 2002).

2.3.3 DISTRIBUCE A POTENCIÁLNÍ FUNKCE V GENOMU

Všechny nejčastěji se vyskytující typy (mono-, di-, tri- a tetranukleotidové repetice) byly nalezeny v nekódujících oblastech napříč sedmi eukaryotickými větvemi. Největší výskyt mikrosatelitů byl zaznamenán v savčím genomu, přičemž v lidském genomu bylo nalezeno více než jeden milion mikrosatelitových lokusů. V případě rostlin neexistuje přímá úměra mezi velikostí genomu a množstvím mikrosatelitové DNA. Velké množství mikrosatelitů se nachází v transpozonech (tzv. mobilních elementech; Katti et al. 2001).

Přestože jsou mikrosatelity obecně považovány za evolučně neutrální *marker* (Ohta and Gillespie 1996), jsou některé studie s touto teorií v rozporu. Poukazují na nenáhodný výskyt v genomu daný selekčním tlakem, který je způsobený výskytem mikrosatelitů v blízkosti důležitých genů a poukazují také na jejich potenciální funkce (Kashi and King 2006; Li et al. 2002). Některé studie ukazují, že mikrosatelity mohou mít vliv na organizaci chromatinu, buněčný cyklus, rekombinaci, opravné systémy či se uplatňují při regulaci genové exprese (Chistiakov et al. 2006).

2.3.4 VYUŽITÍ MIKROSATELITŮ V POPULAČNÍ GENETICE

Spektrum využití mikrosatelitů v biologii je značné, přičemž ty nejdůležitější lze rozdělit do několika kategorií: (1) Mapování genomu, (2) genotypování jedinců a určení genetické diverzity populace či míry toku genů mezi populacemi, (3) zjištění fylogenetických vztahů mezi blízce příbuznými druhy, (4) studium mezidruhové hybridizace (Hoshino et al. 2012; Varshney et al. 2005).

Populačně-genetické otázky lze řešit pomocí statistických metod v závislosti na povaze vstupních dat. Genetická diverzita mezi jedinci/populacemi, tedy jak moc jsou si jedinci v rámci a mezi populacemi podobní/odlišní lze počítat pomocí indexů diverzity na základě počtu polymorfních lokusů a frekvencí jednotlivých alel. Z těchto hodnot lze odhadovat tok genů (*gene flow*) mezi jedinci či jejich reprodukční systém. Recentní děje v populacích se nejčastěji odhadují pomocí genetických vzdáleností mezi jedinci. Často využívanou vzdáleností je *Nei's chord distance*, která vychází z proporce sdílených alel (Nei 1987). Naopak historické děje odvodíme na základě odlišností (divergencí), kdy lze určit počet unikátních alel jedince. Důležitým ukazatelem dějů v populaci jsou také odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy, která předpokládá neomezenou velikost populace, kde neprobíhá žádná migrace, selekce ani genetický drift (Baloux and Lugon-Moulin 2002; Luikart and England 1999).

Ke zjištění genetické variability se často využívá tzv. analýzy molekulární variance (AMOVA), podle které zjistíme podíl variability mezi jedinci v populaci a mezi populacemi, případně skupinami populací (Excoffier et al. 1992). Využijeme-li kodominantního charakteru mikrosatelitových dat, můžeme pro analýzu struktury populací obecně počítat tzv. F-statistiky založené na frekvenci alel (Weir and Cockerham 1984) či analog navržený pro mikrosatelity tzv. R-statistiku (Goodman 1997). Programy pracující s kodominantními daty jsou např. Arlequin (Excoffier and Lischer 2010), SPAGeDi (Hardy and Vekemans 2002) či program MSA (*Microsatellite analyser*), který byl navržený konkrétně pro mikrosatelitová data (Dieringer and Schlötterer 2003).

Pro znázornění vztahů mezi jedinci se využívá mnohorozměrných analýz např. PCoA (*Principal Coordinate Analysis*) a PCA (*Principal Component Analysis*), které redukuje původní n-rozměrný prostor do dvou či tří rozměrného prostoru (Manly 2004). Pro tyto analýzy je nejprve nutné vytvořit sekundární matici dat pomocí koeficientů podobnosti (např. Jaccard 1901) či vzdálenosti (např. Nei 1987).

Další metody umožňující zobrazit vztahy mezi jedinci jsou shlukovací analýzy např. NJ (*Neighbour-joining method*; Saitou and Nei 1987) a UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*; Michener and Sokal 1957).

Další metodou je tzv. Bayesovské klastrování, se kterým pracuje např. program STRUCTURE (Evanno et al. 2005; Pritchard et al. 2000). Tento program hledá na základě molekulárních dat nejlepší rozdělení jedinců do K skupin (genetických clusterů), které je nejpravděpodobnější. STRUCTURE využívá k hledání nejlepšího řešení Markovových řetězců (*Markov chain*), které postupně konvergují k optimálnímu řešení. Na podobném principu pracuje i program BAPS (*Bayesian Analysis of Population Structure*; Corander and Marttinen 2006).

2.3.5 PŘENOS EXISTUJÍCÍCH MIKROSATELITOVÝCH PRIMERŮ – POPIS POUŽITÉ METODY

Analýza mikrosatelitů je založena na PCR technice, pomocí které potřebné sekvence namnožíme (Mullis and Faloona 1987). K tomu je nutné znát okolní sekvence DNA, které jednotlivé mikrosatelitové lokusy ohraničují. Tyto sekvence, na které pak nasedají primery v průběhu PCR reakce, jsou buď publikované v časopisech či na internetu (např. v *Molecular Ecology Resources* či prohledáváním genových bank), nebo je možné si je nechat vyvinout pomocí klasického sekvenování či v současné době pyrosekvenováním,

přičemž tento způsob se stává čím dál více finančně dostupný (Abdelkrim et al. 2009; Pandey and Sharma 2012).

Další alternativou je přenos (cross-amplifikace) z příbuzného druhu, pro který už byl mikrosatelitový set vyvinutý. Tato metoda ovšem nemusí být vždy úspěšná. Hned na počátku je vhodné věnovat pozornost výběru primerů. Při výběru krátkých repetitivních sekvencí je nevýhodou větší náchylnost k tvorbě tzv. *stutter bands* (koktavé proužky), které ale mikrosatelity dobře charakterizují a mohou být nápomocny při odlišování skutečných mikrosatelitů od artefaktů (Levinson and Gutman 1987).

Přenesené mikrosatelity je nutné optimalizovat, aby je bylo možno opakovaně použít. Toho je docíleno testováním gradientu annealingových teplot tj. teplot, při kterých primery nasedají, změnou koncentrace templátové DNA či primeru. Pro vyloučení nevhodných primerů je vhodné otestovat mikrosatelity na malém počtu jedinců pocházejících z odlišných lokalit. Pro snížení laboratorní práce či finančních nákladů je vhodné pokusit se sestavit tzv. multiplex, což je více mikrosatelitových lokusů v jedné PCR reakci. Primery jsou označeny fluorescenční barvou, která jednotlivé naamplifikované lokusy odliší, poté co budou vizualizované na kapilárním sekvenátoru (Guichoux et al. 2011).

2.3.6 VYHODNOCOVÁNÍ PRIMÁRNÍCH MIKROSATELITOVÝCH DAT

Analýzou mikrosatelitových dat, kde porovnáváme délkový polymorfismus alel, získáme pomocí gelové elektroforézy či kapilárního sekvenátoru primární data, která je potřeba dále zpracovat a vyhodnotit dle povahy otázek, které si klademe pro vyřešení daného problému.

Spuštěním výstupního souboru ze sekvenátoru ve vhodném PC softwaru (např. GeneMapper, GeneMarker), jsme schopni jednotlivé alely odečítat. Odečítat alely můžeme dvojím způsobem: (1) Hodnotíme je jako data dominantní, kdy pouze zapisujeme přítomnost/nepřítomnost dané alely (výstupem je binární matice dat), (2) využijeme kodominantního charakteru mikrosatelitů a můžeme odečítat frekvenci alel, přičemž odlišujeme homozygotní jedince od heterozygotních (Guichoux et al. 2011).

Při vyhodnocování primárních dat může docházet kvůli *large allele dropout* (tzn. u heterozygotních jedinců, nedojde k namnožení delší alely při PCR), nulovým alelám (tzn. alely, které nejsou při PCR namnoženy) a *stutter bands* (tzn. o jednu repetici kratší pík umístěný před skutečnou alelou) k chybnému určení počtu alel a v důsledku toho

dochází k podhodnocování/nadhodnocování genetické variability (Dakin and Avise 2004; Walsh et al. 1996).

2.3.7 VYHODNOCOVÁNÍ MIKROSATELITOVÝCH DAT U POLYPLOIDNÍCH DRUHŮ

Většina statistických metod používaných v populační genetice je navržena pro diploidní organismy. Problémy při hodnocení polyploidních dat způsobuje především složitá struktura genomu polyploidních jedinců. Mnoho nástrojů určených primárně pro diploidní jedince proto nelze na polyploidní jedince aplikovat, jelikož by to vedlo k velké nepřesnosti odhadu genetické struktury populací. To se týká především testů založených na Hardy-Weinbergově rovnováze, odhadů heterozygotnosti či indexech diverzity. Ve většině případů v polyploidním genomu nelze určit přesnou frekvenci jednotlivých alel v lokusech (tzv. *allelic dosage*). V praxi to znamená, že tato data musí být vyhodnocována jako dominantní (Dufresne et al. 2014). Problém se týká i různých ploidních úrovní zahrnutých do jedné analýzy. V případě reprodukčně oddělených populací to lze řešit samostatnou analýzou pro každou ploidní úroveň (Münzbergová et al. 2013). Tento způsob je ale u většiny studií nežádoucí vzhledem k možné výměně genetické informace mezi ploidními úrovněmi.

Analýzy polyploidních komplexů jsou nejčastěji realizovány v prostředí R, které slouží přímo pro samotné vyhodnocování dat či generuje vhodně upravené vstupní soubory do jiných programů (R Core Team 2014). Rozdílnost populací je hlavním cílem populační genetické analýzy, přičemž s polyploidními mikrosatelitovými daty umí pracovat např. R skript POLYSAT, který přepočítává aktuální genotypové frekvence alel v populaci na alelické frekvence fenotypu (Clark and Jasieniuk 2011). Často využívaným koeficientem pro výpočet diferencovanosti populace u polyploidních jedinců je tzv. Rho-st koeficient (Meirmans and Van Tienderen 2013). Alternativou výpočtu vzdáleností mezi jedinci pro mikrosatelitová polyploidní data je tzv. BRUVO *distance*, která vypočítá vzdálenost mezi jedinci za předpokladu, že délková variance mezi alelami může být způsobena sklouznutím (*slippage*) DNA polymerázy. To může vést k nadhodnocování vzdáleností mezi jedinci s různou ploidní úrovní (Bruvo et al. 2004).

2.4 TAXONOMICKÉ VYMEZENÍ RODU *CHENOPODIUM* V SYSTÉMU CÉVNATÝCH ROSTLIN

2.4.1 VÝVOJ ČELEDI *AMARANTHACEAE* JUSS.

Rod *Chenopodium* je v současné době řazen do čeledi *Amaranthaceae* Juss. (podčeď *Chenopodioideae*). Jako sesterská skupina je udávána malá neotropická čeleď *Achatocarpaceae* Heimerl. Čeleď *Amaranthaceae* představuje nejdíverzifikovanější linii řádu *Caryophyllales* Juss. ex Bercht. & J. Presl, přičemž podíl na tom má sloučení čeledi s dříve samostatnou čeledí *Chenopodiaceae* Vent. (APG III 2009). Sloučení čeledi *Amaranthaceae* a *Chenopodiaceae* bylo již dříve navrženo na základě společných morfologických, anatomických a fyziologických vlastností (Baillon 1887; Judd et al. 1999; Rodman 1990). Systém APG I (1998) spojil tyto dvě čeledi na základě morfologických dat a molekulárních analýz. Kadereit et al. (2003) na základě své fylogenetické analýzy toto spojení do jedné čeledi nepodporují, ovšem kvůli nízké statistické podpoře jednotlivých větví fylogenetického stromu, založeného na údajích z chloroplastové *rbcL* oblasti, neposkytli přesvědčivý důkaz pro opětovné rozdělení na dvě čeledi.

2.4.2 VÝVOJ PODČELEDI *CHENOPODIOIDEAE* (*AMARANTHACEAE*)

Monofyletičnost podčeledi *Chenopodioideae* byla potvrzena až na základě molekulární fylogenetické analýzy založené na sekvenaci chloroplastové DNA *matK/trnK* oblasti (Müller and Borsch 2005). Podle revidovaného systému APG III (2009) je dnes v čeledi *Amaranthaceae* rozlišována kromě podčeledi *Chenopodioideae* ještě podčeď *Amaranthoideae*, *Gomphrenoideae*, *Salicornioideae* a *Salsoloideae*. Fuentes-Bazan et al. (2012a, 2012b) na základě analýzy jaderné (ITS) a chloroplastových (*matK/trnK*) oblastí genů rozlišili v této podčeledi celkem 6 nezávislých větví: *Chenopodium* s. str., *Chenopodiastrum* = *Ch. murale*, *Oxybasis* = *Ch. rubrum*, *Lipandra* = *Ch. polyspermum*, *Blitum* = *Ch. capitatum* a *Dysphania-Teloxys* (obrázek 1; Fuentes-Bazan et al. 2012b).

2.4.3 KLASIFIKACE RODU *CHENOPODIUM*

Rod *Chenopodium* byl původně popsán jako dva rody *Blitum* L. a *Chenopodium*, které byly rozlišeny na základě počtu tyčinek (Linnaeus 1753). I přes některé opačné názory (Scott 1978) se obvykle tyto původně 2 popsané rody uvádějí pod jedním rodovým jménem *Chenopodium*. Jednou z nejkomplexnějších studií je práce Aellena (1960), který rozdělil rod do 13 sekcí. Klasifikace rodu ovšem činí taxonomické problémy vznikající

především kvůli morfologické variabilitě rodu. Jednotlivé taxony prošly značnými přestavbami zejména na úrovni podrodů a sekcí, které jsou uvedeny v tabulce 1, která shrnuje přehled členění rodu *Chenopodium* v časovém kontextu.

S rozvojem molekulárních metod se změnil i náhled na klasifikaci tohoto rodu. Důležitou analýzu založenou na molekulárních datech poskytli Kadereit et al. (2010), když zařadili aromatické druhy rodu *Chenopodium*, *Cycloloma* Moq., *Suckleya* A. Gray a *Teloxys* Moq. do samostatného tribu *Dysphanieae*. Podrobnou fylogenetickou analýzu široce pojatého rodu *Chenopodium* předkládá Fuentes-Bazan et al. (2012a, 2012b). Ze studie vystupuje rod *Chenopodium* s. l. jako parafyletický vůči ostatním rodům z čeledi. Jejich fylogenetické údaje ukazují, že větev *Dysphania* má vysokou statistickou podporu a zahrnuje aromatické druhy rodu *Chenopodium*: *Ch. ambrosioides* L., *Ch. graveolens* Willd., *Ch. melanocarpum* (J. M. Black) J. M. Black, *Ch. multifidum* L., *Ch. pumilio* R. Br., *Ch. schraderianum* Schult. a *Ch. aristatum* L. Větev *Ch. capitatum* zahrnuje druhy: *Ch. capitatum* (L.) Asch., *Ch. californicum* S. Watson, *Ch. bonus-henricus* L., *Ch. foliosum* Asch. a *Monolepis nuttalliana* (Schult.) Greene. Větev *Ch. rubrum* zahrnuje *Ch. rubrum* L., *Ch. glaucum* L., *Ch. chenopodioides* (L.) Aellen a *Ch. urbicum* L. Další větví je *Ch. murale* se čtyřmi druhy: *Ch. murale* L., *Ch. hybridum* L., *Ch. coronopus* Moq. a *Ch. badachschanicum* Tzvelev. Větev *Ch. polyspermum* zde zahrnující pouze *Ch. polyspermum* L. je zde oddělena od nejdiverzifikovanější sesterské větve *Chenopodium* s. str. (obrázek 1).

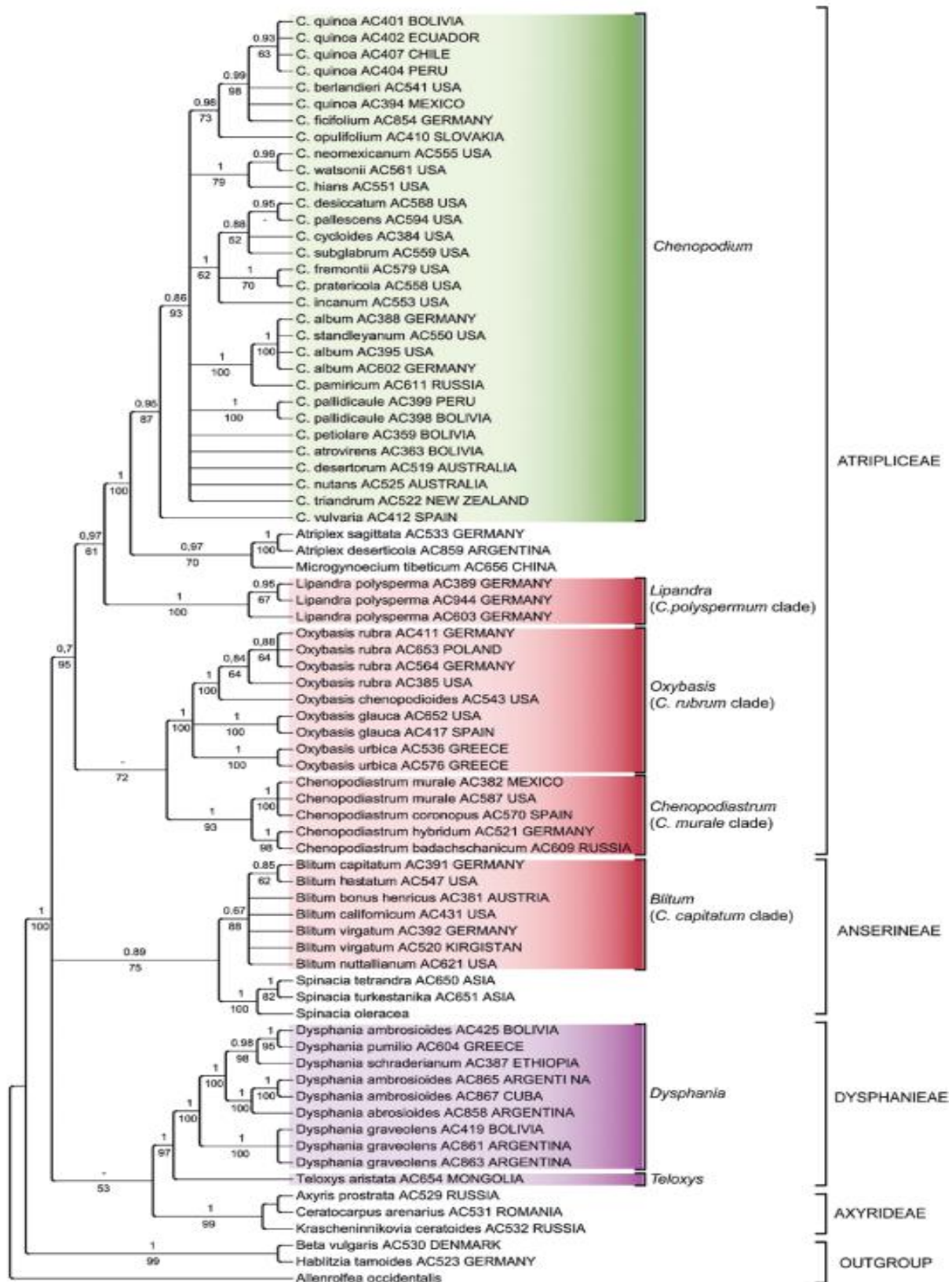
2.4.4 POZICE SKUPINY *CHENOPODIUM ALBUM*

Skupina *Chenopodium album* byla poprvé uvedena v sekci *Chenopodiastrum* v roce 1919 (Graebner 1919). Do skupiny Graebner zařadil 9 druhů: *Ch. leptophyllum* (Moq.) Nutt. ex S. Watson, *Ch. album*, *Ch. quinoa*, *Ch. amaranticolor* H. J. Coste & Reyn., *Ch. opulifolium* Schrad. ex W. D. J. Koch & Ziz, *Ch. ficifolium*, *Ch. berlandieri*, *Ch. striatum* Murr a *Ch. hircinum* Schrad. Druhové složení skupiny se ale v průběhu doby velmi měnilo, především díky popisování dalších nových druhů (Aellen and Just 1943; Akeroyd 1993; Uotila 1978).

Chenopodium album je dle nejnovější studie řazen do větve *Chenopodium* s. str. v podčeledi *Chenopodioideae*. Tato větev se dále člení na 3 větší skupiny, ovšem pro odlišné morfologické synapomorfnní znaky není vztah mezi těmito skupinami ještě s jistotou vyřešen (Fuentes-Bazan et al. 2012b).

Tabulka 1 Vývoj klasifikace rodu *Chenopodium*. První sloupec obsahuje jméno a rok kdy byl taxon popsán, další sloupce člení rod do tří úrovní: Rodu, podrodu a sekce. Převzato a upraveno dle Rahiminejad (1995).

Jméno + rok	Rod	Podrod	Sekce
Linnaeus 1773	<i>Chenopodium</i> L.	–	–
	<i>Blitum</i> L.	–	–
Meyer 1829	<i>Chenopodium</i> L.	<i>Chenopodia</i> C. A. Mey.	–
		<i>Botryoides</i> C. A. Mey.	–
	<i>Blitum</i> L.	–	–
Graebner 1919	<i>Chenopodium</i> L.	<i>Euchenopodium</i> Gren.	<i>Ambrina</i> (Spach) Hook. f.
			<i>Botrydium</i> (Spach) Hook. f.
			<i>Chenopodiastrum</i> Moq.
		<i>Blitum</i> (L.) Aschers.	<i>Orthosporum</i> R. Br.
			<i>Pseudoblitum</i> (Gren.) Aschers.
			<i>Morocarpus</i> (Boehm.) Aschers.
			<i>Agathophyton</i> (Moq.) Aschers.
Ulbrich 1934	<i>Chenopodium</i> L.	–	<i>Euchenopodium</i> (Gren.) Ulbr.
			<i>Rhagodioides</i> Benth.
			<i>Skottsbergia</i> Aellen (1931)
			<i>Agathophyton</i> (Moq.) Aschers.
			<i>Roubieva</i> (Moq.) Rouy
			<i>Ambrina</i> (Spach) Hook. f.
			<i>Botryoides</i> (C. A. Mey.) Gren.
			<i>Orthosporum</i> R. Br.
			<i>Tetrasepala</i> Aellen (1930)
			<i>Degenia</i> Aellen (1927)
			<i>Pseudoblitum</i> (Gren.) Aschers.
			<i>Eublitem</i> (Moq.) Aellen (1930)
			<i>Tellungia</i> Aellen (1931)
Aellen 1960	<i>Chenopodium</i> L.	–	<i>Botryoides</i> (C. A. Mey.) Gren.
			<i>Ambrina</i> (Spach) Hook. f.
			<i>Tetrasepala</i> Aellen
			<i>Orthosporum</i> R. Br.
			<i>Roubieva</i> (Moq.) Rouy
			<i>Agathophyton</i> (Moq.) Aschers.
			<i>Tellungia</i> Aellen
			<i>Eublitem</i> (Moq.) Aellen
			<i>Pseudoblitum</i> (Gren.) Aschers.
			<i>Degenia</i> Aellen
			<i>Polygonoidea</i> Aellen
			<i>Auricoma</i> Aellen
			<i>Chenopodium</i>
Scott 1978	<i>Blitum</i> L.	–	–
	<i>Chenopodium</i> L.	<i>Ambrosia</i> A. J. Scott	<i>Atriplicina</i> Aellen (1931)
			<i>Margaritaria</i> Brenan (1956)
			<i>Meiomeria</i> (Standl. 1916) A. J. Scott
			<i>Botryoides</i> (C. A. Mey.) Gren.
			<i>Roubieva</i> (Moq.) Rouy
			<i>Orthosporum</i> R. Br.
		<i>Chenopodium</i> L.	<i>Skottsbergia</i> Aellen
			<i>Auricoma</i> Aellen
			<i>Rhagodioides</i> Benth.
			<i>Agathophyton</i> (Moq.) Aschers.
			<i>Tellungia</i> Aellen
			<i>Chenopodium</i> L.
			<i>Degenia</i> Aellen
			<i>Polygonoides</i> Aellen
			<i>Leprophyllum</i> Dumort.



Obrázek 1 Fylogenetický strom *Chenopodium* s. l. založený na molekulární analýze *trn-L* a *matK/trnK* DNA oblasti s posteriorní pravděpodobností umístěnou u jednotlivých větví. Převzato a upraveno dle Fuentes-Bazan et al. (2012b).

2.5 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA STUDOVANÉ SKUPINY

2.5.1 CHARAKTERISTIKA ČELEDI *AMARANTHACEAE*

Čeleď *Amaranthaceae* zahrnuje 160 rodů a 2400 druhů rostlin (APG III 2009). Mezi nejdůležitější rody v této čeledi bývají označovány rod *Chenopodium*, *Atriplex* L., *Salsola* L. a *Beta* L. Zástupci čeledi se nachází jak v mírném (např. *Amaranthus* L.), tak v subtropickém či tropickém pásmu (např. *Suaeda* Forssk. ex Scop.). Někteří obývají aridní a semi-aridní oblasti či se jedná o druhy specializované k růstu na zasolených půdách. Mnoho zástupců jsou jednoleté byliny, ale najdeme zde i byliny vytrvalé (např. *Chenopodium bonus-henricus*), keře (např. *Atriplex halimus* Pall.) či liány (např. *Charpentiera* Gaudich.). Nacházejí se zde jak plevelné druhy (*Chenopodium album* s. str.), tak i kulturní plodiny (např. rod *Spinacia* L.; Kadereit et al. 2003).

Mnoho zástupců čeledi je známo C4 typem fotosyntézy (např. *Atriplex*, *Salsola*, *Amaranthus*, *Suaeda*, *Gomphrena* L.). Rostliny s tímto typem fotosyntézy preferují oblasti jako savany, slaniska, pouště a polopouště. Dalším typickým znakem čeledi je produkce betalainů místo antokyanů. (Kadereit et al. 2003).

2.5.2 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA SKUPINY *CHENOPODIUM ALBUM*

Rod *Chenopodium* je celosvětově rozšířený a bývá zde rozlišováno přibližně 160 druhů. Patří sem převážně jednoleté, dvouleté a zřídka vytrvalé druhy či keře obývající nejčastěji původní společenstva pouští, polopouští a stepí. U některých zástupců byl areál jejich výskytu druhotně rozšířen člověkem (Kühn et al. 1993).

Zástupci skupiny *Chenopodium album* jsou mnohdy celosvětově rozšíření a obvykle se jedná o jednoleté druhy. Často se vyskytují na člověkem narušovaných stanovištích a jejich areály jsou v důsledku vazby na lidskou činnost druhotně značně rozšířeny. Zástupci mají nevonné a často hustě nahloučené květy, které poukazují na anemofilii a samosprašnost. Semena jsou často hluboce dormantní a jsou schopna klíčit i po několika letech (Aellen and Just 1943; Aellen 1960).

Uotila (2001) uvádí, že zástupci skupiny *Ch. album* jsou morfologicky značně proměnliví, zejména ve výšce rostliny a ve velikosti listů. Obtížnost při rozlišování jednotlivých druhů je dána velkou fenotypovou plasticitou, výskytem více ploidních hladin a předpokládanou hybridizací.

POČET CHROMOZOMŮ A PLOIDNÍ ÚROVNĚ

Na základě chromozomových počtů bylo ve skupině *Ch. album* stanoveno základní chromozomové číslo $x = 9$. V Evropě se vyskytují diploidní ($2n = 2x = 18$), tetraploidní ($2n = 4x = 36$) a hexaploidní ($2n = 6x = 54$) druhy (Kolano et al. 2008).

2.6 CHARAKTERISTIKA STUDOVANÝCH DRUHŮ

2.6.1 *CHENOPODIUM FICIFOLIUM* SM. – MERLÍK FÍKOLISTÝ

MORFOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

Variabilní druh zejména ve výšce lodyhy, která je vzpřímená až vystoupavá, rýhovaná, nezřetelně vícehranná, 80–150(–180) cm vysoká. Listy jsou světle zelené, s čepelí 1–7 cm dlouhou a 0,5–3,0 cm širokou. Čepel je zvláště u spodních listů zřetelně trojlaločná a úzce kosníkovitá, 4× delší než široká s prodlouženým středním úkrojkem, který je 2–3× delší než úkrojky vedlejší. Dolní listy mají výrazný řapík. Povrch listu je na lici lysý či pomoučený, rub je pomoučený. Okraj listu je celokrajný až zubatý. Květenství je větvená vodorovně rozložená licholata s 5–20květymi kloubíčky. Květy jsou velmi malé v průměru 1,3–1,8 mm, často jednotlivé a také pomoučené. Okvětí je do $\frac{1}{2}$ srostlé a okvětní lístky jsou na vnější straně zaoblené až nepatrně kýlnaté. Nažky jsou v obrysu okrouhlé, v průměru mají 0,8–1,0 mm. Osemení je čtyř až mnohoúhelníkovitě jamkované, připomínající včelí plásty (Dostálek et al. 1990).

ROZŠÍŘENÍ A EKOLOGIE

Na území střední Evropy pravděpodobně původní diploidní druh ($2n = 2x = 18$), rostoucí od jižní Evropy až po východní Asii. Druhotně se vyskytuje i v Severní Americe. Na našem území je hojný především v nižších polohách, termofytiku i v teplém mezofytiku. Z oreofytika nebyl doposud doložen. Obývá ruderalní, narušená a dusíkem obohacená stanoviště, především komposty, okraje hnojišť, smetiště. Je součástí vegetace obnažených den (Dostálek et al. 1990).

2.6.2 *CHENOPODIUM SUECICUM* MURR – MERLÍK ŠVÉDSKÝ

MORFOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

Lodyha většinou vzpřímená, 40–90(–130) cm vysoká, šikmo odstále větvená, nezřetelně vícehranná a více či méně rýhovaná, většinou s úzkými zelenavými pruhy. Velmi variabilní druh, zejména ve tvaru a velikosti listů. Listy jsou světle zelené až olivově zelené s délkou čepele (–1)4–7(–8) cm a širokou (–1)3–5(–6) cm s široce klínovitou či tupou bází. Tvar čepele je vejčitý až kosníkovitý, na vrcholu tupě špičatý či špičatý. Okraj dolních a středních listů je ostře zubatý. Listy jsou střídavé, někdy se spodními vstřícnými listy, řapíkaté (4–6 cm) a velmi tenké. V raném stádiu jsou z obou stran pomoučené. Květenství je listnatá licholata s vrcholičnatými stopkatými klubíčky. Květy jsou často jednotlivé. Okvětí je do $\frac{1}{2}$ srostlé a okvětní lístky jsou vejčité a člunkovitě prohnuté. Okvětní lístky jsou na hřbetě kýlnaté až křídlaté. Nažky jsou v obrysu kruhovitě, v průměru mají 1,1–1,4 mm. Osemení je paprskovitě rýhované až zbrázděné (Dostálek et al. 1990).

ROZŠÍŘENÍ A EKOLOGIE

Diploidní druh ($2n = 2x = 18$) na území střední Evropy pravděpodobně původní, ale jeho rozšíření není dostatečně známo. Vyskytuje se především na severní polokouli s těžištěm v boreálním pásu. Na našem území se nachází od nížin do podhůří, běžně v termofytiku a mezofytiku, s ojedinělým výskytem v oreofytiku. Obývá ruderalní, na dusík bohatá stanoviště, zejména komposty, silážní jámy, skládky či se vyskytuje na okraji železnic. Také se začleňuje do polních kultur (Dostálek et al. 1990).

2.6.3 *CHENOPODIUM STRICTUM* ROTH – MERLÍK TUHÝ

MORFOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

Lodyha obvykle vzpřímená až vystoupavá, 40–120 cm vysoká, hladká a nevýrazně vícehranná. Od báze bohatě obloukovitě větvená, zpravidla červeně až tmavě zeleně pruhovaná. V paždí horních větví s červenými skvrnami. Listy jsou střídavé, spodní listy někdy vstřícné, tmavě zelené, často v dospělosti načervenalé či lemované. Čepel je vejčitě kopinatá či vejčitě eliptická až podlouhlá u spodních listů, 2–8 cm dlouhá a 1–4 cm široká. Okraj listů je nepravidelně zubatý až celokrajný, při bázi obvykle se zubem na každé

straně. Horní listy jsou téměř celé celokrajné či nepravidelně jemně zubaté. Nejčastěji se na rostlině vyskytují listy krátce řapíkaté. Květenství je stažený lichoklas s kulovitými přisedlými kloubíčky. Okvěť je do $\frac{1}{3}$ srostlé. Okvětní lístky jsou na vnější straně slabě kýlnaté. Nažky jsou v obrysu široce vejčité až okrouhlé, v průměru mají 1,0–1,3 mm. Osemení je více či méně hladké (Dostálek et al. 1990).

ROZŠÍŘENÍ A EKOLOGIE

Tetraploidní nepůvodní druh ($2n = 4x = 36$) střední Evropy, zavlečený pravděpodobně ze střední Asie. Dnes se vyskytuje po celém světě. Na našem území se vyskytuje od nížin do podhůří, hojně až roztroušeně v termofytiku, méně často také v mezofytiku a ojediněle v oreofytiku. V termofytiku roste na okrajích železnic, skládek, navážek a dalších rudérálních stanovištích. V teplých oblastech roste na hlinitých a písčitých půdách (Dostálek et al. 1990).

2.6.4 *CHENOPODIUM STRIATIFORME* MURR – MERLÍK DROBNOLISTÝ

MORFOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

Lodyha je vzpřímená až vystoupavá, 30–50(–90) cm vysoká, pruhovaná, nevýrazně hranatá, zelená až načervenalá, od báze s odstálými větvemi, které mají v paždí červené skvrny. Větvě jsou oproti hlavní lodyze tenké, prutovité a obloukovitě vystoupavé. Listy jsou na líci sivozelené a lysé, na rubu tmavě zelené a pomoučené. Čepel dolních listů je kosníkovitě vejčitá až kopinatá, 2,5–3,5 cm dlouhá a 0,8–2,0 cm široká. Okraj listu je zubatý až celokrajný, na bázi obvykle klínovitý a na vrcholu špičatý. Čepel horních listů je 1,5–2,5 cm dlouhá a 0,5–1,5 cm široká s celokrajným či drobně zubatým okrajem. Květenství je lichoklas s mnoha kulovitými přisedlými kloubíčky. Okvěť srůstá na bázi a okvětní lístky jsou mírně kýlnaté. Nažky jsou v obrysu více či méně široce oválné, v průměru mají 1,1–1,2 mm. Osemení bývá hladké (Dostálek et al. 1990).

ROZŠÍŘENÍ A EKOLOGIE

Tetraploidní nepůvodní druh ($2n = 4x = 36$) střední Evropy, rostoucí v rámci Evropy od jižní do severní a západní Evropy, přes Ukrajinu, až do Malé Asie. Na našem území rozšíření není dostatečně známé, přičemž hlavní výskyt má v termofytiku a proniká i do mezofytika. Zde obývá obvykle rudérální stanoviště jako železniční stanice, paty zdí

obrácené směrem k jihu či roste podél komunikací. Upřednostňuje písčité lehké půdy (Dostálek et al. 1990).

2.6.5 *CHENOPODIUM ALBUM* L. S. STR. – MERLÍK BÍLÝ

MORFOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

Velmi variabilní druh ve všech vegetativních částech. Lodyha je vzpřímená, 10–70(–150) cm vysoká, světle zelená, chudě až bohatě větvená, obvykle pomoučená, nevýrazně hranatá. Bývá zeleně, žlutozeleně či červeně rýhovaná a slabě pomoučená. Listy jsou střídavé, řapíkaté, v dospělosti obvykle světle zelené až žlutavé. Dolní listy jsou kosníkovité, kosníkovitě vejčité či kosočtverečně kopinaté. Čepel je 2,0–3,5(–5) cm dlouhá a 0,8–2,0 cm široká. Čepel je ostře zubatá, na bázi klínovitá a na vrcholu zašpičatělá. Čepel horních listů je kopinatá, 1,0–2,5 cm dlouhá a 0,2–0,7 cm široká, celokrajná až drobně zubatá, na vrcholu zašpičatělá. Květenství je bezlistý lichoklas či licholata s mnoha nahloučenými přisedlými kloubíčky. Okvěti je srostlé do $\frac{1}{5}$ až $\frac{1}{3}$, s nevýrazně kýlnatými okvětními lístky. Nažky jsou v obrysu vejčité až okrouhlé, v průměru mají 1,2–1,4 mm. Osemení je hladké či s nevýraznými brázdami (Dostálek et al. 1990).

ROZŠÍŘENÍ A EKOLOGIE

Hexaploidní druh ($2n = 6x = 54$) s centrem rozšíření v mírném pásu, ale vyskytuje se po celém světě. Jeho původ není známý. Na našem území udáván z většiny fytogeografických okresů, ovšem jeho rozšíření není přesně známe kvůli častým záměnám s blízce příbuznými druhy. Jedná se o jeden z nejhojnějších segetálních a ruderalních druhů. Roste na organických a minerálních půdách, které jsou slabě podmaččené a rychle vysychají, ale nemá speciální nároky na pH půdy (Dostálek et al. 1990).

2.7 HYBRIDIZACE A ROLE POLYPLOIDIE VE SKUPINĚ *CHENOPODIUM ALBUM*

2.7.1 MEZIDRUHOVÁ HYBRIDIZACE RODU *CHENOPODIUM*

Obecně platí, že skupina *Chenopodium album* je problematická z důvodu nedostatku výrazných morfologických znaků, které by jasně diferencovaly jednotlivé druhy. Wahl (1954) ve své studii rodu *Chenopodium* ze Severní Ameriky uvádí: „V žádné skupině, která je srovnatelná svojí velikostí, nedošlo k tak velkému nepochopení taxonů jako u rodu *Chenopodium*, především u druhů z okruhu *Ch. album* a *Ch. berlandieri*.“ Domnívá se, že identifikační problémy jsou způsobeny zejména rozsáhlou morfologickou variabilitou. Vedle značné morfologické variability jednotlivých druhů nebylo po dlouhou dobu zcela zřejmé, do jaké míry se může na značné morfologické variabilitě podepisovat mezidruhovía hybridizace. Mnozí autoři uvádí, že přírodní hybridi ale nejsou tak častí, jak někteří autoři tvrdí a role hybridizace v rámci skupiny *Ch. album* je nadhodnocená. (Cole 1961; Uotila 1978, 2001).

Cole (1957) se domníval, že díky přenosu pylu pomocí větru nemůže hrát prostorová bariéra roli při křížení druhů mezi sebou a uvádí celkem 30 % cizosprašení ve skupině *Ch. album*, které by mělo být dostatečné pro úspěšnou hybridizaci. První pokus o umělou hybridizaci uskutečnil Cole (1957, 1961) mezi britskými druhy *Ch. album* a *Ch. suecicum*. Jeho experimentální výsledky ukázaly, že v mnoha případech došlo k vyklíčení pylového zrna v pylovou láčku, avšak poté došlo k zamezení průchodu pylové láčky do zárodečného vaku. Poukázal také na to, že sezónní izolace by neměla hrát žádnou roli v prevenci proti křížení mezi druhy a díky anemogamii je prostorová izolace také vyloučena. Došel k závěru, že neexistují žádné prezygotické překážky pro křížení druhů mezi sebou ve volné přírodě. Ovšem neposkytl žádný důkaz o tom, že by ke křížení mezi druhy v přírodě opravdu docházelo. Přestože Cole uvedl, že by sezónní izolace neměla hrát roli při křížení, Stace (1975) naznačuje, že by roli při křížení mohla hrát délka dne, jelikož tvrdil, že druhy *Ch. suecicum* a *Ch. album* jsou rostliny krátkodenní, alespoň v indukci kvetení. Nicméně také poukázal na to, že skupina *Ch. album* obsahuje druhy více či méně nezávislé na délce dne. Stace (1975) při zkoumání hybridizace rodu *Chenopodium* přisuzoval problémy při určování druhů extrémní plasticitě morfologických znaků. Zkoumal také hybridizaci mezi britskými druhy skupiny *Ch. album*. Z celkového počtu publikovaných 27 hybridů, ale věřil, že ke skutečné hybridizaci může docházet pouze mezi

třemi druhy: (1) *Ch. album* a *Ch. berlandieri*, (2) *Ch. album* a *Ch. opulifolium* a mezi *Ch. album* a *Ch. hircinum*.

Aellen (1960) v rámci skupiny popsal 14 hybridních kombinací, ovšem podíl ustálených kříženců je neznámý. Uotila (1978) po přezkoumání literatury zaměřené na hybridní druhy ze skupiny *Ch. album* v severní Evropě poukázal na to, že většina těchto jedinců, kteří byli určeni jako hybridi, pocházeli ze sekundárních stanovišť a často se nacházeli mimo přirozený výskyt alespoň jednoho z rodičů. Tvrdil, že k hybridizaci může docházet jen mezi *Ch. album* a *Ch. opulifolium*. Ostatní jedinci determinovaní jako hybridi byli rostliny, které vyklíčily a vyrostly později, aniž by tvořily semena. Dvořák mezi roky 1983–1992 studoval původ řady taxonů a popsal mnoho hybridů patřící do skupiny *Ch. album*. Z důvodu absence podrobných chemických a experimentálních důkazů je ovšem nutno na všechny jeho popsané hybridní druhy a domnělé hybridní kombinace nahlížet s jistou opatrností (Dvořák et al. 1983; Dvořák 1989a, 1989b, 1992).

Hybridizací mezi vybranými druhy skupiny *Ch. album* se na území ČR zabývali Mandák et al. (2012), přičemž k umělé hybridizaci použili 5 druhů s podobnou fenologií kvetení. Podporují hypotézu, že v přírodě dochází k hybridizaci mezi ploidními úrovněmi velmi vzácně či vůbec, jelikož nenašli žádné hybridní jedince vzniklé křížením druhů s různými ploidními. Díky tomu se dá uvažovat přítomnost mnoha přechodných forem, které nejsou výsledkem hybridizace, ale kombinace samooplození a fenotypové plasticity.

2.7.2 PŮVOD POLYPLOIDNÍCH DRUHŮ SKUPINY *CHENOPODIUM ALBUM*

Jedna z prvních molekulárních studií zabývajících se vztahy ve skupině *Ch. album* v Indii byla založena na kombinaci isozymové analýzy, analýzy obsahu proteinů v semenech a RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) metodě (Gangopadhyay et al. 2002). Prezентují hypotézu alopolyloidního vzniku hexaploidního druhu *Ch. album* na základě použitých metod. Do studie byly zahrnuty dva diploidní typy *Ch. album* (jeden typ se širokými listy a druhý s úzkými listy), hexaploidní *Ch. album* a diploidní druh *Ch. murale*. Výsledky ukázaly, že dva diploidní typy *Ch. album* jsou si velmi blízcí jak mezi sebou, tak s hexaploidním typem, avšak diploidní *Ch. murale* měl od nich v RAPD analýze vzdálenější pozici. Vznik hexaploidního *Ch. album* vysvětlují hybridizací dvou diploidních typů *Ch. album* následovanou polyploidizací a další hybridizací s diploidním druhem *Ch. murale*.

Rahiminejad a Gornall (2004) zkoumali pomocí sekundárních metabolitů (flavonoidů) alopolyloidní původ rodu *Chenopodium* se zaměřením na původ hexaploidních druhů. Do analýzy zahrnuli diploidní, tetraploidní a hexaploidní druhy. Profil hexaploidních jedinců se téměř shodoval s diploidními druhy *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum* a proto se domnívají, že potenciální rodiče hexaploidního *Ch. album* jsou právě tyto dva diploidní druhy (nebo jim druhy blízké příbuzní).

Původ *Ch. album* s. str. je stále nejasný, ale ve třetí studii, zabývající se původem polyploidních druhů na základě experimentálního křížení a průtokové cytometrie, předpokládají vznik *Ch. album* z diploidního a tetraploidního druhu (Mandák et al. 2012). Původ tetraploidních druhů je také nejasný, ale kvůli pozdější fenologii *Ch. strictum* (září–říjen) je téměř jisté, že se tento druh nemůže křížit s diploidními druhy, které kvetou v červenci. Na základě velikosti genomu stanovené pomocí průtokové cytometrie, tetraploidní jedinci nevykazovali dvojnásobné množství DNA proti diploidním druhům, což nasvědčuje tomu, že tetraploidní jedinci nevznikli autopolyploidizací diploidních druhů (Mandák et al. 2012).

Původ hexaploidních jedinců *Ch. album* také zkoumali pomocí průtokové cytometrie a experimentálního křížení, ve kterém nebyl detekován žádný triploidní ani pentaploidní jedinec, a proto určili nejpravděpodobnější způsob vzniku hexaploidních jedinců fúzí neredukovaných gamet z diploidního a tetraploidního předka. Celkem byly navrženy 4 potenciální cesty vzniku hexaploidního *Ch. album*: (1) Splynutí neredukované a redukované gamety diploidních předků a následná polyploidizace přes triploidní meziprodukt, (2) hybridizace diploidního a tetraploidního jedince a následná polyploidizace, (3) fúze neredukovaných gamet z diploidního a tetraploidního jedince, (4) splynutí neredukované a redukované gamety z dvou tetraploidních jedinců (Mandák et al. 2012).

3 METODIKA

3.1 VZORKY POUŽITÉ NA TESTOVÁNÍ VARIABILITY MIKROSATELITOVÝCH MARKERŮ

Rostlinný materiál, který jsem použila pro přenos mikrosatelitových markerů z *Ch. quinoa* na 5 zástupců skupiny *Ch. album* (*Ch. ficifolium* $2n = 2x = 18$, *Ch. suecicum* $2n = 2x = 18$, *Ch. strictum* $2n = 4x = 36$, *Ch. striatiforme* $2n = 4x = 36$ a *Ch. album* s. str. $2n = 6x = 54$) a na odhad genetické variability jednotlivých mikrosatelitových lokusů, byl vybrán ze sbírky druhů rodu *Chenopodium* vedené Oddělením genetické ekologie Botanického ústavu AV ČR, v. v. i. v Průhonicích (BÚ AV ČR). Jednotlivé vzorky jsou uchovávány buď ve formě DNA, anebo ve formě usušených listů skladovaných v čajových sáčkích uložených v silikagelu v plastových krabičkách. Použité vzorky je možné rozdělit do dvou skupin: 1) Vzorky použité na přenos mikrosatelitových primerů sebrané na území České republiky v letech 2004–2007 (tabulka 2) a (2) vzorky použité pro sestavení mikrosatelitových multiplexů a počáteční odhad genetické variability mikrosatelitových lokusů (tabulka 3). Ty byly nasbírány ve vegetační sezóně 2013 v rámci grantového projektu GA ČR: Význam hybridizace a polyploidizace v evoluci *Chenopodium album* agg.: Od biosystematiky ke genovým expresím, jejímž řešitelem je Bohumil Mandák. Populace byly sbírány na území Evropy a jedinci byli vybráni metodou náhodného odběru cca po 5 m podél liniového transektu. Vhodné populace na testování genetické variability již přenesených mikrosatelitových markerů jsem vybrala tak, aby populace každého druhu byly z dostatečně vzdálených oblastí v rámci Evropy. Do této studie jsem zahrнула 4 populace *Ch. suecicum*, *Ch. ficifolium* a *Ch. strictum*, 1 populaci *Ch. striatiforme* a 5 populací *Ch. album*. Populace byly reprezentovány 9–10 jedinci (tabulka 3). U každého jedince použitého na testování byla známa ploidie stanovená pomocí průtokové cytometrie (FCM = *flow cytometry methods*). Podrobná metodika postupu stanovení ploidie a použité přístrojové vybavení je podrobně uvedena v publikaci Mandák et al. (2012).

Tabulka 2 Vzorky použité na přenos mikrosatelitových primerů z *Ch. quinoa* vybrané podle databáze rodu *Chenopodium* vedené Oddělením genetické ekologie BÚ AV ČR. V prvním sloupci je uvedeno číslo, pod kterým je daný druh veden v databázi Oddělení genetické ekologie BÚ AV ČR. Další sloupce obsahují název druhu, zeměpisnou šířku (N), zeměpisnou délku (E), název lokality, typ stanoviště kde byl daný druh nalezen, datum sběru a sběratelé.

No	Druh	Souřadnice (N)	Souřadnice (E)	Lokalita	Stanoviště	Datum sběru	Sběratelé
1	<i>Ch. striatiforme</i>	50°06'38"	14°26'07"	Praha, Holešovice	na okraji silnice	25. 11. 2004	B. Mandák
19	<i>Ch. album</i>	49°58'56"	14°29'53"	Vestec (Praha-západ)	čerstvě nahrnutá zemina	20. 11. 2004	B. Mandák
20	<i>Ch. album</i>	49°58'56"	14°29'53"	Vestec (Praha-západ)	čerstvě nahrnutá zemina	20. 11. 2004	B. Mandák
22	<i>Ch. suecicum</i>	50°06'45"	14°26'48"	Praha, Holešovice	násyp železniční trati	10. 4. 2005	B. Mandák
32	<i>Ch. striatiforme</i>	50°06'59"	14°25'59"	Praha, Troja	podél silnice	10. 4. 2005	B. Mandák
34	<i>Ch. album</i>	50°06'59"	14°25'59"	Praha, Troja	podél silnice	10. 4. 2005	B. Mandák
64	<i>Ch. album</i>	50°05'55"	14°26'29"	Praha, Holešovice	nasypaná zemina	25. 7. 2005	B. Mandák
65	<i>Ch. strictum</i>	50°05'55"	14°26'29"	Praha, Holešovice	nasypaná zemina	25. 7. 2005	B. Mandák
87	<i>Ch. quinoa</i>	–	–	Index seminum	–	–	–
88	<i>Ch. quinoa</i>	–	–	Index seminum	–	–	–
118	<i>Ch. strictum</i>	50°05'31"	14°34'31"	Praha, Dolní Počernice	skládka	13. 9. 2005	B. Mandák
124	<i>Ch. strictum</i>	50°00'37"	15°17'29"	Starý Kolín (Kolín)	volná ruderalní plocha	15. 9. 2005	B. Mandák et al.
189	<i>Ch. strictum</i>	49°47'03"	14°42'02"	Benešov	–	2007	B. Mandák et D. Kořínková
193	<i>Ch. striatiforme</i>	50°04'26"	14°25'09"	Praha, Karlovo náměstí	–	2007	B. Mandák et D. Kořínková
197	<i>Ch. striatiforme</i>	50°06'45"	14°29'54"	Praha, nádraží Vysočany	–	2007	B. Mandák et D. Kořínková
200	<i>Ch. ficifolium</i>	49°47'03"	14°42'02"	Benešov	–	2007	B. Mandák et D. Kořínková
202	<i>Ch. ficifolium</i>	50°11'02"	13°30'24"	Běsno	chmelnice	2007	B. Mandák et D. Kořínková
205	<i>Ch. suecicum</i>	49°47'03"	14°42'02"	Benešov	–	2007	B. Mandák et D. Kořínková
221	<i>Ch. album</i>	–	–	–	–	–	D. Ohri

Tabulka 3 Vzorky použité na testování a optimalizaci mikrosatelitových multiplexů a počáteční odhad genetické variability vybraných mikrosatelitových lokusů. V prvním sloupci je uvedeno číslo, pod kterým je populace daného druhu vedena v databázi Oddělení genetické ekologie BÚ AV ČR. Další sloupce obsahují název druhu (populace), zeměpisnou šířku (N), zeměpisnou délku (E), název lokality, typ stanoviště kde byl daný druh nalezen, rok sběru, počet odebraných jedinců na populaci a sběratelé.

No	Druh	Souřadnice (N)	Souřadnice (E)	Lokalita	Stanoviště	Datum sběru	Počet	Sběratelé
264	<i>Ch. suecicum</i>	54°52'00"	24°12'56"	Litva, Rumšiškės	pole	2013	10	B. Mandák
271	<i>Ch. ficifolium</i>	50°02'16"	15°21'35"	ČR, Týnec nad Labem	železniční nádraží	2013	9	B. Mandák et P. Vít
276	<i>Ch. ficifolium</i>	50°14'04"	15°25'44"	ČR, Nový Bydžov	volné ložiště hnoje	2013	10	B. Mandák et P. Vít
277	<i>Ch. suecicum</i>	50°14'04"	15°25'44"	ČR, Nový Bydžov	volné ložiště hnoje	2013	10	B. Mandák et P. Vít
282	<i>Ch. suecicum</i>	50°19'12"	14°58'44"	ČR, Rejšice	obnažené rybníční dno	2013	10	B. Mandák et P. Vít
293	<i>Ch. album</i>	46°47'53"	19°02'40"	Maďarsko	pata zdi	2013	10	B. Mandák, P. Vít, K. Krak et A. Brčáková
299	<i>Ch. album</i>	46°52'55"	19°27'21"	Maďarsko, Fülöpháza	polní kultura	2013	10	B. Mandák, P. Vít, K. Krak et A. Brčáková
300	<i>Ch. strictum</i>	46°53'09"	19°23'51"	Maďarsko, Fülöpháza	na písku	2013	10	B. Mandák, P. Vít, K. Krak et A. Brčáková
301	<i>Ch. strictum</i>	47°50'57"	18°30'29"	Slovensko, Gbelce	nádraží, pata zdi	2013	10	B. Mandák, P. Vít, K. Krak et A. Brčáková
303	<i>Ch. album</i>	47°48'25"	18°41'44"	Slovensko, Nána	ruderální plocha	2013	10	B. Mandák, P. Vít, K. Krak et A. Brčáková
304	<i>Ch. ficifolium</i>	47°48'25"	18°41'44"	Slovensko, Nána	ruderální plocha	2013	10	B. Mandák, P. Vít, K. Krak et A. Brčáková
307	<i>Ch. ficifolium</i>	47°44'36"	18°19'33"	Slovensko, Virt	zasolená volná plocha	2013	10	B. Mandák, P. Vít, K. Krak et A. Brčáková
308	<i>Ch. album</i>	47°44'36"	18°19'33"	Slovensko, Virt	zasolená volná plocha	2013	10	B. Mandák, P. Vít, K. Krak et A. Brčáková
309	<i>Ch. strictum</i>	47°44'36"	18°19'33"	Slovensko, Virt	zasolená volná plocha	2013	10	B. Mandák, P. Vít, K. Krak et A. Brčáková
328	<i>Ch. suecicum</i>	50°10'37"	14°06'20"	ČR, Švermov	navážka zeminy	2013	10	B. Mandák, P. Vít et A. Brčáková
329	<i>Ch. album</i>	50°13'35"	14°12'38"	ČR, Slatina	volné ložiště hnoje v poli	2013	10	B. Mandák, P. Vít et A. Brčáková
331	<i>Ch. striatiforme</i>	50°20'58"	14°29'51"	ČR, Mělník	nádraží, pata zdi	2013	10	B. Mandák, P. Vít et A. Brčáková
380	<i>Ch. strictum</i>	50°06'57"	14°25'60"	ČR, Praha, Trojský most	ruderální plocha v okolí silnice	2013	9	J. Doua, J. Doudová et V. Hadincová

3.2 VZORKY POUŽITÉ NA ANALÝZY ODHADU TOKU GENŮ MEZI STUDOVANÝMI DRUHY

Pro odhalení frekvence mezidruhové hybridizace a tudíž i možnosti recentního vzniku *Ch. album* s. str. jsem našla 5 lokalit společného výskytu všech studovaných druhů na území České republiky. Sběr probíhal ve vegetační sezóně 2014 v období červenec–srpen. Vybrané smíšené populace měly na každé lokalitě jinou velikost, a proto jsou populace početně různě zastoupeny. Celkem bylo na lokalitách nasbíráno 911 jedinců (211 *Ch. ficifolium*, 237 *Ch. suecicum*, 85 *Ch. strictum*, 91 *Ch. striatiforme* a 287 *Ch. album* s. str.). Na jedné lokalitě (Podbořanský Rohozec, rybník Velký Rohozec) se mi podařilo nalézt smíšenou populaci pouze tří druhů (*Ch. suecicum*, *Ch. ficifolium*, *Ch. album* s. str.). Sběr probíhal na lokalitě formou náhodného výběru jedinců sebraných postupně po družích, cca 2–5 m vzdálených od sebe. Sbírány byly 3–4 zdravé listy z rostliny, které jsem ukládala přímo na místě do čajových sáčků uchovávaných v plastových krabičkách se silikagelem. Číslo populace odpovídá záznamu v databázi kolekce rodu *Chenopodium* vedené Oddělením genetické ekologie BÚ AV ČR (tabulka 4). Každá rostlina *Ch. album* s. str. byla sebrána jako dokladová položka a uložena v herbářové sbírce Bohumila Mandáka na Oddělení genetické ekologie (BÚ AV ČR). Vzorky listů problematických rostlin, které nebylo možné s jistotou přiřadit k určitému druhu, jsem uložila do igelitových sáčků s vodou a převezla do Botanického ústavu, kde byla jejich ploidie stanovena pomocí průtokové cytometrie. Jednalo se zejména o krajní morfotypy hexaploidního druhu *Ch. album* a tetraploidního druhu *Ch. strictum*, které jsou si zejména na extrémnějších stanovištích mnohdy velmi podobné. V takovém případě určení ploidie daného jedince vede k potvrzení druhové příslušnosti. Informace o místě sběru, typu stanoviště či přesný počet odebraných jedinců na populaci jsou shrnuty v tabulce 4.

Tabulka 4 Vzorky použité na analýzy odhadu toku genů mezi studovanými druhy a na odhalení možnosti recentního vzniku *Ch. album* nasbírané ve vegetační sezóně 2014 na území České republiky. V prvním sloupci je uvedeno číslo, pod kterým je populace daného druhu vedena v databázi Oddělení genetické ekologie BÚ AV ČR. Další sloupce obsahují název druhu, zeměpisnou šířku (N), zeměpisnou délku (E), název lokality, typ stanoviště kde byl daný druh nalezen, datum sběru, počet odebraných jedinců na populaci a sběratelé.

No	Druh	Souřadnice (N)	Souřadnice (E)	Lokalita	Stanoviště	Datum sběru	Počet	Sběratelé
561	<i>Ch. striatiforme</i>	50°06'45"	14°24'45"	Praha 7 – Bubeneč, Císařský ostrov	navážky hlíny a stavebního materiálu	8. 7. 2014	23	E. Kondrysová et al.
562	<i>Ch. strictum</i>	50°06'45"	14°24'45"	Praha 7 – Bubeneč, Císařský ostrov	navážky hlíny a stavebního materiálu	8. 7. 2014	15	E. Kondrysová et al.
563	<i>Ch. ficifolium</i>	50°06'45"	14°24'45"	Praha 7 – Bubeneč, Císařský ostrov	navážky hlíny a stavebního materiálu	8. 7. 2014	50	E. Kondrysová et al.
564	<i>Ch. suecicum</i>	50°06'45"	14°24'45"	Praha 7 – Bubeneč, Císařský ostrov	navážky hlíny a stavebního materiálu	8. 7. 2014	43	E. Kondrysová et al.
565	<i>Ch. album</i>	50°06'45"	14°24'45"	Praha 7 – Bubeneč, Císařský ostrov	navážky hlíny a stavebního materiálu	8. 7. 2014	65	E. Kondrysová et al.
568	<i>Ch. album</i>	50°14'31"	13°25'23"	Podbořany, cca 1,6 km SV od kostela v obci	skládka - navážky stavební suti	11. 7. 2014	61	E. Kondrysová et al.
569	<i>Ch. strictum</i>	50°14'31"	13°25'23"	Podbořany, cca 1,6 km SV od kostela v obci	skládka - navážky stavební suti	11. 7. 2014	36	E. Kondrysová et al.
570	<i>Ch. suecicum</i>	50°14'31"	13°25'23"	Podbořany, cca 1,6 km SV od kostela v obci	skládka - navážky stavební suti	11. 7. 2014	53	E. Kondrysová et al.
571	<i>Ch. ficifolium</i>	50°14'31"	13°25'23"	Podbořany, cca 1,6 km SV od kostela v obci	skládka - navážky stavební suti	11. 7. 2014	9	E. Kondrysová et al.
572	<i>Ch. striatiforme</i>	50°14'31"	13°25'23"	Podbořany, cca 1,6 km SV od kostela v obci	skládka - navážky stavební suti	11. 7. 2014	4	E. Kondrysová et al.
576	<i>Ch. ficifolium</i>	50°12'17"	13°17'05"	Podbořanský Rohozec, rybník Velký Rohozec	opuštěné pole při S okraji rybníka	11. 7. 2014	50	E. Kondrysová et al.
577	<i>Ch. suecicum</i>	50°12'17"	13°17'05"	Podbořanský Rohozec, rybník Velký Rohozec	opuštěné pole při S okraji rybníka	11. 7. 2014	50	E. Kondrysová et al.
579	<i>Ch. album</i>	50°12'17"	13°17'05"	Podbořanský Rohozec, rybník Velký Rohozec	opuštěné pole při S okraji rybníka	11. 7. 2014	50	E. Kondrysová et al.
581	<i>Ch. strictum</i>	50°05'02"	14°16'11"	Hostivice, železniční nádraží	ruderalizovaná plocha před výstavbou dálnice	16. 7. 2014	1	E. Kondrysová et al.
582	<i>Ch. striatiforme</i>	50°05'02"	14°16'11"	Hostivice, železniční nádraží	ruderalizovaná plocha před výstavbou dálnice	16. 7. 2014	34	E. Kondrysová et al.
583	<i>Ch. album</i>	50°05'02"	14°16'11"	Hostivice, železniční nádraží	ruderalizovaná plocha před výstavbou dálnice	16. 7. 2014	53	E. Kondrysová et al.
584	<i>Ch. ficifolium</i>	50°05'02"	14°16'11"	Hostivice, železniční nádraží	ruderalizovaná plocha před výstavbou dálnice	16. 7. 2014	46	E. Kondrysová et al.
585	<i>Ch. suecicum</i>	50°05'02"	14°16'11"	Hostivice, železniční nádraží	ruderalizovaná plocha před výstavbou dálnice	16. 7. 2014	50	E. Kondrysová et al.
597	<i>Ch. ficifolium</i>	49°56'30"	14°23'43"	Praha-západ, Vrané nad Vltavou	okraj silnice - jiloviště + navážka hlíny	7. 8. 2014	50	E. Kondrysová et al.
598	<i>Ch. suecicum</i>	49°56'30"	14°23'43"	Praha-západ, Vrané nad Vltavou	okraj silnice - jiloviště + navážka hlíny	7. 8. 2014	47	E. Kondrysová et al.
599	<i>Ch. album</i>	49°56'30"	14°23'43"	Praha-západ, Vrané nad Vltavou	okraj silnice - jiloviště + navážka hlíny	7. 8. 2014	58	E. Kondrysová et al.
600	<i>Ch. striatiforme</i>	49°56'30"	14°23'43"	Praha-západ, Vrané nad Vltavou	okraj silnice - jiloviště + navážka hlíny	7. 8. 2014	30	E. Kondrysová et al.
601	<i>Ch. strictum</i>	49°56'30"	14°23'43"	Praha-západ, Vrané nad Vltavou	okraj silnice - jiloviště + navážka hlíny	7. 8. 2014	33	E. Kondrysová et al.

3.3 IZOLACE DNA

Veškeré laboratorní analýzy jsem dělala v laboratoři populační genetiky BÚ AV ČR. DNA 19 vzorků použitých na přenos mikrosatelitových primerových párů (tabulka 2) mi byla poskytnuta již vyextrahovaná. Vzorky vybrané pro optimalizaci multiplexů a počáteční odhad genetické variability mikrosatelitů (tabulka 3), jakožto i vzorky použité na analýzy odhadu toku genů mezi studovanými druhy (tabulka 4), jsem izolovala pomocí kitu DNeasy 96 Plant Kit (Qiagen) jejíž postup je popsán dále.

Touto metodou lze najednou vyizolovat DNA ze 192 vzorků. Podrobný postup je uveden v příloženém manuálu k této sadě *DNeasy[®] Plant Handbook* (2012; Qiagen). Postupovala jsem dle protokolu *Frozen Plant Tissue* s několika změnami. Vzhledem k tomu, že jsem na extrakci použila sušený materiál skladovaný v silikagelu, nebyl použit tekutý dusík, který se v tomto protokolu používá. Přibližně 15–20 mg rostlinného materiálu každého vzorku jsem postupně umístila do dvou sad zkumavek, které jsou součástí kitu. Do každé zkumavky jsem vložila 1 wolframkarbidovou kuličku o průměru 3 mm. Rostlinný materiál byl nadrcen pomocí homogenizátoru TissueLyseru II (Qiagen) s použitím sady adapterů na 2 × 96 vzorků (viz manuál *TissueLyser Handbook*, 2010; Qiagen). Vzorky byly drceny o rychlosti 30 Hz přibližně 2 min. Na zahřátí pufrů (AP3/E, AP1) jsem použila termoblok (*The Cube Dry Bath Incubator*; Thermo Scientific). Na centrifugaci vzorků jsem použila centrifugu Heraeus Multifuge X3R (Thermo Fisher Scientific) s rotorem na 2 × 96 vzorků. Pro zvýšení koncentrace izolované DNA jsem přidala v posledním kroku 2 × 30 µl AE pufru (10 mM Tris·Cl; 0,5 mM EDTA, pH 9,0), který je součástí kitu. Všechny vzorky izolované touto metodou byly uchovávány ve zkumavkách v mrazáku při –20 °C.

3.3.1 MĚŘENÍ KONCENTRACE A TESTOVÁNÍ KVALITY DNA

Koncentraci DNA u všech izolovaných vzorků použitých na analýzu jsem měřila pomocí spektrofotometru NanoDrop[™] 2000 (viz manuál *NanoDrop[™] 2000/2000c Spectrophotometer*; Thermo Scientific). Všechny vzorky jsem před měřením zamíchala pomocí Vortex Mixer VX-200 (Labnet International, Inc.) a krátce centrifugovala (cca 30 sec) na Spectrafuge[™] Mini Centrifuge C1301 (Labnet International) či na Centrifuge 5430R (Eppendorf). Jako standart BLANK jsem před měřením vlastních vzorků nanesla 1 µl ddH₂O (destilovaná, deionizovaná a sterilizovaná voda). Poté jsem pipetovala na spektrofotometr 1 µl izolované DNA a mezi jednotlivými vzorky jsem po

měření otřela kapku buničinou. V počítačovém programu NanoDrop 2000/2000c jsem vyexportovala soubor, který obsahoval název vzorku s množstvím vyizolované DNA v ng/μl, podle které jsem vzorky ředila na požadovanou hodnotu. Velikost absorbance UV 260/280 udávající obsah proteinů v DNA (optimální rozmezí je mezi 1,8–2,0) a UV 260/230 udávající obsah sekundárních metabolitů např. fenolických látek (optimální rozmezí je mezi 1,8–2,2), byly brány v úvahu při výběru vhodných vzorků pro následující analýzy.

Pro zjištění kvality izolované DNA jsem použila agarózovou elektroforézu (Cleaver Scientific, Ltd.). Jako zdroj napětí jsem použila Power supply MP-250V a MP-300V (Cleaver Scientific, Ltd.). Nejprve jsem si připravila 1% agarózový gel (tabulka 5). Do Erlenmeyerovy baňky jsem si na digitálních vahách Kern 272 (KERN & Sohn GmbH) navážila agarózu (SERVA) a rozpustila v potřebném množství 1× TAE pufru (Tris-acetate-EDTA buffer; 40 mM Tris, 20 mM kyselina octová, 1 mM EDTA). Roztok byl zahříván 1–2 min v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění krystalků. Po zchlazení tekoucí vodou na cca 50 °C jsem připipetovala 1 μl ethidium bromidu (c = 10 mg/ml; Sigma-Aldrich). Roztok agarózy jsem přelila do plastové elektroforetické vaničky s hřebeny a nechala gel ztuhnout (cca 20–30 min). Na parafilmu jsem smíchala 3 μl DNA s cca 0,3 μl sledovacího barviva 6X Loading Dye Solution (Fermentas). Na gel jsem nanesla 2 μl této směsi. Jako *marker* pro odhad koncentrace a degradace DNA jsem na gel nanesla 1 μl Lambda DNA (Thermo Scientific). Zdroj napětí byl nastaven na 100 V/130 mA po dobu 20–30 min. Pro dokumentaci DNA jsem použila dokumentační systém InGenius a software GeneSnap (Syngene, Synoptics Ltd.). Vzorky s degradovanou DNA jsem z analýz vyloučila. Všechna DNA použitá pro další analýzy byla ředěna ddH₂O na výslednou koncentraci 15 ng/μl.

Tabulka 5 Potřebné množství 1× TAE pufru (ml) a agarózy (g) na přípravu agarózového gelu při použití odlišných elektroforetických vaniček (ELFO) a odlišné hustotě gelu.

		1× TAE pufr	Množství agarózy potřebné pro přípravu agarózového gelu	
			1%	2,5%
malá ELFO	10 × 7 cm	35 ml	0,35 g	0,88 g
	10 × 10 cm	50 ml	0,5 g	1,25 g
velká ELFO	15 × 7 cm	52,5 ml	0,53 g	1,32 g
	15 × 10 cm	75 ml	0,75 g	1,88 g
	15 × 15 cm	112,5 ml	1,13 g	2,82 g

3.4 TESTOVÁNÍ MIKROSATELITOVÝCH PRIMERŮ A MULTIPLEX PCR

3.4.1 CROSS-AMPLIFIKACE A OPTIMALIZACE PCR

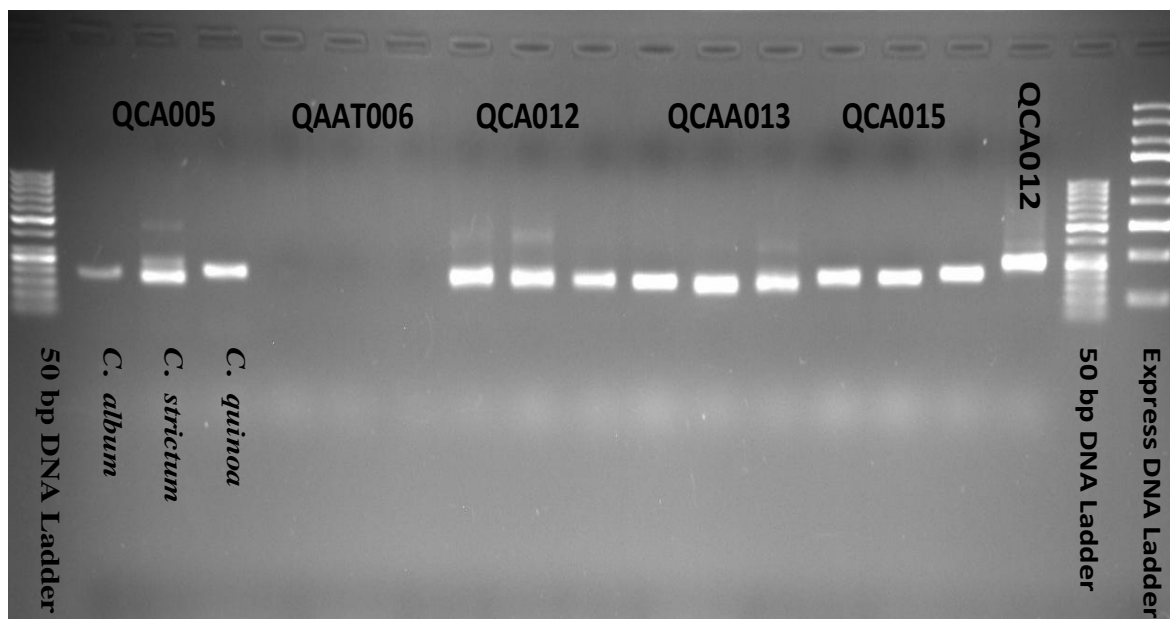
Jelikož pro studované druhy nebyly vyvinuté žádné mikrosatelitové markery a pro blízce příbuzný druh *Ch. quinoa* jich bylo vyvinuto 613 (Jarvis et al. 2008; Mason et al. 2005), rozhodla jsem se je zkusit otestovat u studovaných zástupců *Ch. album*. Testování probíhalo formou cross-amplifikace mikrosatelitových markerů tj. jejich amplifikací u studovaných druhů pomocí PCR. Pro první testování jsem vybrala 68 primerových párů (Sigma-Aldrich). Vybrané mikrosatelity mají jednoduchý (*simple*) typ repetice a motiv repetitivní jednotky se skládá ze dvou či tří nukleotidů (tabulka 6). Originální lyofilizované primery jsem rozpustila přidáním ddH₂O tak, aby výsledná koncentrace byla 100 µM. Tyto zásobní primery jsem poté naředila do 1,5 ml zkumavek na výslednou pracovní koncentraci 10 µM.

Tabulka 6 Testované mikrosatelitové lokusy vybrané na cross-amplifikaci. První sloupec značí pořadové číslo lokusu. Následuje jméno lokusu uvedené v Mason et al. (2005), motiv repetice, sekvence *forward* a *reverse* primeru a fluorescenční značení u lokusů vybraných do multiplexů.

No	Lokus	Motiv	Sekvence <i>forward</i> primeru (5'-3')	Sekvence <i>reverse</i> primeru (5'-3')	Značka
1	QCA005	(CA) ₁₆	gtggttcattggctgatcctt	cttgccatcagggcatactt	–
2	QAAT006	(AAT) ₁₁	cacaacaataattcaaccgaaga	cgctgacgcttaacattcg	–
3	QCA012	(TG) ₉	tcccatatgcctacgtaccaa	tggtcatcaacatccaaagg	PET
4	QCAA013	(CAA) ₈	cccacaacacataccaccaa	tcgtggttggttgtaaatctt	–
5	QCA015	(AC) ₁₇	tgggaccctgatagcttgac	tgtcctttgcatgtgctatga	NED
6	QGA016	(TC) ₁₃	atttcaacacaagcccaacc	tttgaggaggagaaagtgg	VIC
7	QATG019	(ATC) ₁₂	ccaaacaagacaataaggaaacc	cgaggttgaaggagattcca	–
8	QATG029	(TCA) ₉	tgatgcattgacagaagcag	ccgttgatgatggatatgatg	–
9	QAAT029	(TTA) ₁₆	gagcagagcagattccaaca	aacaggattgggttcgctat	PET
10	QAAT040	(AAT) ₈	ggcttcccactcatttggg	agagcaaagcaggagtcagc	–
11	QAAT046	(ATT) ₁₂	tcgctatagcttgaggagtgg	aaagaacgagccaaagggtg	–
12	QCA046	(CA) ₁₈	gcaggtaaatcaacccttgc	tgcataataactaagcagacga	NED
13	QATG051	(ATG) ₇	aacctcagcagcctgttcct	tcaggtgcttcgtcatcctc	–
14	QCA053	(TG) ₂₅	agatgtggtgcgttgatct	aaggagagctctaaccgcttg	–
15	QCA056	(TG) ₁₃	ttggaagagctccacaaggt	cctctgaataggataccctctgt	PET
16	QAAT057	(AAT) ₁₄	cggtccctaccaatttctt	atcacctgctgtgatttcc	VIC
17	QAAT062	(TAA) ₂₇	cacaagtgcgcataagcaaag	ccagtacacgcacgaagaaa	–
18	QAAT066	(ATT) ₁₅	cagatgcattgaccttcgtg	cacattgtatctcggcttcc	PET
19	QAAT071	(ATT) ₃₀	catcacccgctgaatagacac	taccctaagtccacgattcc	–
20	QCA074	(TG) ₁₄	tgaacttggtgccatcttgg	cggaggaagtatttaacaagggtg	–
21	QAAT074	(ATT) ₁₄	atggaacacccatccgataa	atgcctatcctcatcctcca	–
22	QATG081	(GAT) ₆	caagttgaggcgaggatta	ccagtgaactactgcgacgtt	–
23	QAAT088	(ATT) ₃₀	tcctaactcttgtgacatttcctt	ccacgatccagaacaattt	–

24	QAAT096	(AAT) ₂₈	atgccacggttcctatacc	gccacacagtaccacaaca	–
25	QCA096	(TG) ₁₃	ccatgttattgatgtcttgcctc	ctgctggctgttagctgttg	–
26	QCA107	(TG) ₁₂	acaggctgtgggtccactt	tcaagcaatactacacctgttg	–
27	QCA108	(TG) ₄	ggtgctgcgatctgcttc	acagcacgaccaaaccaaa	NED
28	QCA115	(CA) ₁₃	gcatgtaccttatgtgtgttttc	tctttcacgcttgcgatg	6-FAM
29	QCA116	(CA) ₂₅	gaacaaggaaagtaagtaagcatgg	ctttgtggaaatgcctggtc	NED
30	QAAT010	(AAT) ₉	tgaatcgaacggaggaag	gggtaggactgatgccaga	–
31	QAAT012	(AAT) ₁₀	tcaagtgtgggatgcttgaa	ccgacagacgaggagacaa	VIC
32	QAAT014	(AAT) ₁₄	ccacacagacatgccttcac	acatcacaagctcaccacca	NED
33	QAAT022	(TTA) ₂₉	tgtcgatatagatgaacaaaa	ggagcccagattgtatctca	–
34	QAAT024	(ATT) ₁₀	accataacagcacccacctt	agggatcaatctgttcattca	–
35	QAAT025	(ATT) ₂₂	gcagagcagagcaaatttca	tcactcacctaatactatatgcac	NED
36	QAAT026	(TAT) ₁₇	attacataaatgaacaactttt	ccagattgtatctcgactcc	–
37	QAAT041	(ATT) ₈	gcagcgacctcactaggattac	ccagattgtatctcggcttcc	PET
38	QAAT051	(AAT) ₁₄	ccttcgacaaggtcccatta	cgtccatagtggaggcattt	–
39	QAAT065	(AAT) ₁₄	tcgaaggaaatgaaaatgagga	acggctgatttgaatgagg	NED
40	QAAT070	(AAT) ₁₅	tgaacaggatcgtcatagtcaa	cgttcacatctgacccaat	–
41	QAAT075	(ATT) ₁₈	gcttcgagcagagcagagt	gggaccagattgtgtcttg	–
42	QAAT078	(AAT) ₂₂	agcgaaggaaatttgaact	taacgatacgtccaaggaa	–
43	QAAT097	(AAT) ₁₈	aaatcatttgacttttaggttt	gatgtgataaggaataatccaa	–
44	QAAT111	(ATT) ₁₄	ttcttgatgcaccttaattctt	aaagctcgttctgctattatt	–
45	QAAT112	(ATT) ₁₃	cccgatccaccataagagaa	tgaagtgtagattggagaatgaca	–
46	QATG001	(CAT) ₈	cataacatcctatagaaccgttc	tgctcctacttactcattgactcat	–
47	QATG012	(ATC) ₈	ggcaaacacatggatctcaa	caaacagcgaagagggttcc	6-FAM
48	QATG020	(GAT) ₈	tcgaagtttcgaattgatgg	caggtttcacatagccttgtg	–
49	QATG026	(CAT) ₇	tcaggtgcttcgcatcatc	agcagcctgttcatccaatc	–
50	QATG028	(ATG) ₈	cctatggtgggagtgaggag	gggcgtgatcaagcaataac	VIC
51	QATG033	(ATG) ₆	ttctggttgatggcggtt	cgggagcatctccaccta	–
52	QATG035	(GAT) ₁₂	tgggtgaagcagttgtgaaga	gcttcagctcaatctagaacaca	6-FAM
53	QATG038	(CAT) ₁₆	tgaccataaagctgctggaa	tgatgaggattctgatggtga	6-FAM
54	QATG048	(TCA) ₅	ccctcctcgcttaacaactc	tcgactaatctatgaatctcctca	6-FAM
55	QATG059	(CAT) ₆	cagtcaaatccagcgaac	gccttcgcaaatcgtaagac	PET
56	QATG062	(GAT) ₆	gatgtgccagcagatgagag	tgtctatgaacagcatccaagg	NED
57	QATG064	(ATG) ₁₁	tcttcagcaggttggttc	tcacatcgtcgtcgttgc	VIC
58	QATG069	(ATG) ₁₅	accgatgatgatgtcaacga	agtcgaaacttgagccatgc	–
59	QATG093	(GAT) ₉	aacatgaaatcccgatccaa	tcctaagcccttaagtgtgatt	–
60	QATG100	(GAT) ₈	atgttgattgcatgtggtgtc	gagagagaacaagaacaaaggcta	–
61	QCA013	(CA) ₁₂	tcaacttaacaacaatgtacatcaa	tccgaactatgaaatctgactctg	–
62	QCA021	(CA) ₁₆	cagggtatcagaatactgggaaa	ccaagattggaggacaggaa	PET
63	QCA026	(TG) ₁₂	ttccaatacagcaccacctc	tgcaagcatacataagacagtca	PET
64	QCA027	(CA) ₁₅	attgctccaaacctgcaaa	tttcgggatatataggctgt	–
65	QCA029	(CA) ₁₀	tctacttgcaacccgaatgtc	cgcgaagcaaatcaggtaca	VIC
66	QCA030	(CA) ₁₃	tcattggtagatggtggaatg	ccctctagtgcataggagtttctg	6-FAM
67	QCA034	(CA) ₁₆	agggagaatgcggagaaga	tcaacaacaagcacgaagg	–
68	QAAT087	(ATT) ₃₀	tcctaacttctgtgacatttcctt	ccacgatcccagaacaattt	–

Každý mikrosatelitový primerový pár (*forward* + *reverse*) jsem nejprve testovala a optimalizovala v samostatné PCR reakci na několika jedincích od každého druhu (*Ch. ficifolium*, *Ch. suecicum*, *Ch. strictum*, *Ch. striatiforme*, *Ch. album* s. str.). Celkem jsem použila 19 vzorků (tabulka 2). Jako pozitivní kontrolu jsem použila jedince *Ch. quinoa*. Namnožení mikrosatelitů pomocí PCR probíhalo v celkovém objemu 10 μ l. PCR mix pro jednu reakci obsahoval: 5 μ l koncentrovaného QIAGEN Multiplex PCR Master Mixu (Qiagen), 0,2 μ M primeru a 30 ng templátové DNA. Při přípravě premixu, který v první analýze zahrnoval 5 reakcí, jsem vždy připravila o jednu reakci navíc, kvůli možným ztrátám při chybném pipetování (viz *QIAGEN® Multiplex PCR Handbook*, 2010; Qiagen). Amplifikace probíhala na gradientovém cycleru Mastercycler® pro S (Eppendorf). Teplotní podmínky reakce jsem v prvním pokusu nastavila následovně: Víko cycleru před zahájením reakce bylo zahříváno na 105 °C. DNA byla denaturována 15 min při 95 °C, následovalo 35 cyklů denaturace 95 °C/30 sec, annealingu – nasedání primerů (t_a) 55 °C/30 sec a elongace 72 °C/30 sec. Doba závěrečné elongace byla 10 min při 72 °C. Po skončení reakce byly vzorky ochlazeny na 4 °C. Úspěšnost amplifikace jsem testovala pomocí agarózové elektroforézy (obrázek 2). Postup přípravy a vyhodnocování gelu byl až na uvedené výjimky shodný s již uvedeným postupem pro testování kvality izolované DNA. PCR produkt byl vyhodnocen na 2,5% agarózovém gelu s přidáním 2 μ l ethidium bromidu. Jako velikostní *marker* jsem používala GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas) či GeneRuler™ Express DNA Ladder (Fermentas). Na gel jsem nanesla 2 μ l PCR produktu. Elektroforetická reakce probíhala cca 30 min při 130–150 V/150 mA. Pokud na gelu nebyl PCR produkt jasně zřetelný (jeden proužek) či k amplifikaci nedošlo, optimalizovala jsem podmínky PCR nejčastěji snížením či zvýšením annealingové teploty (t_a), kterou jsem postupně měnila v rozmezí 55–58 °C. Pro odstranění více PCR produktů odlišné délky jsem zvyšovala dobu závěrečné elongace, až na 30 min. Dále jsem měnila koncentraci primerů v PCR mixu, kterou jsem zvýšila až na 0,3 μ M.



Obrázek 2 Ukázka testování mikrosatelitových lokusů na 2,5% agarózovém gelu při délce běhu elektroforézy 25 min a 130 V. Na obrázku lze vidět amplifikaci daných lokusů u dvou studovaných druhů (*Ch. album* s. str., *Ch. strictum*) a pozitivní kontroly (*Ch. quinoa*). Druhý lokus (QAAT006) se zde neamplifikoval ani u jednoho vzorku.

Mikrosatelitové markery, které na gelu vykazovaly jasný proužek u všech studovaných druhů, byly označeny fluorescenčními barvami 6-FAM[™], NED[™], PET[®], VIC[®] (Applied Biosystems). V prvním pokusu jsem značené primery testovala v samostatných reakcích, vždy na jednom jedinci z každé populace/druhu (tabulka 3) za podmínek, které vedly k úspěšné amplifikaci s neznačenými primery. PCR produkt jsem poté naředila 10× přidáním ddH₂O a připravila vzorky na fragmentační analýzu, která probíhala na sekvenátoru se 4 kapilárami (ABI PRISM 3130 Genetic Analyser; Applied Biosystems). Vzorky na fragmentační analýzu obsahovaly: 12 µl Hi-Di[™] formamidu (Applied Biosystems) + 0,1 µl interního velikostního standardu GeneScan[™] 500 LIZ[™] (Applied Biosystems) + 1 µl naředěného PCR produktu. Tento mix jsem krátce zamíchala a centrifugovala 2 min/520 × g rcf (2000 rpm) na Centrifuge MPW-351R (MPW Med. instruments). Poté byl vzorek denaturován 5 min při 95 °C v termo bloku (*The Cube Dry Bath Incubator*; Thermo Scientific) a ihned po skončení cyklu jsem ho umístila na mrazicí stojánek. Takto připravené vzorky byly před fragmentační analýzou uchovávány v lednici při 4 °C.

3.4.2 OPTIMALIZACE MULTIPLEX PCR A IMPLEMENTACE NA ANALÝZY

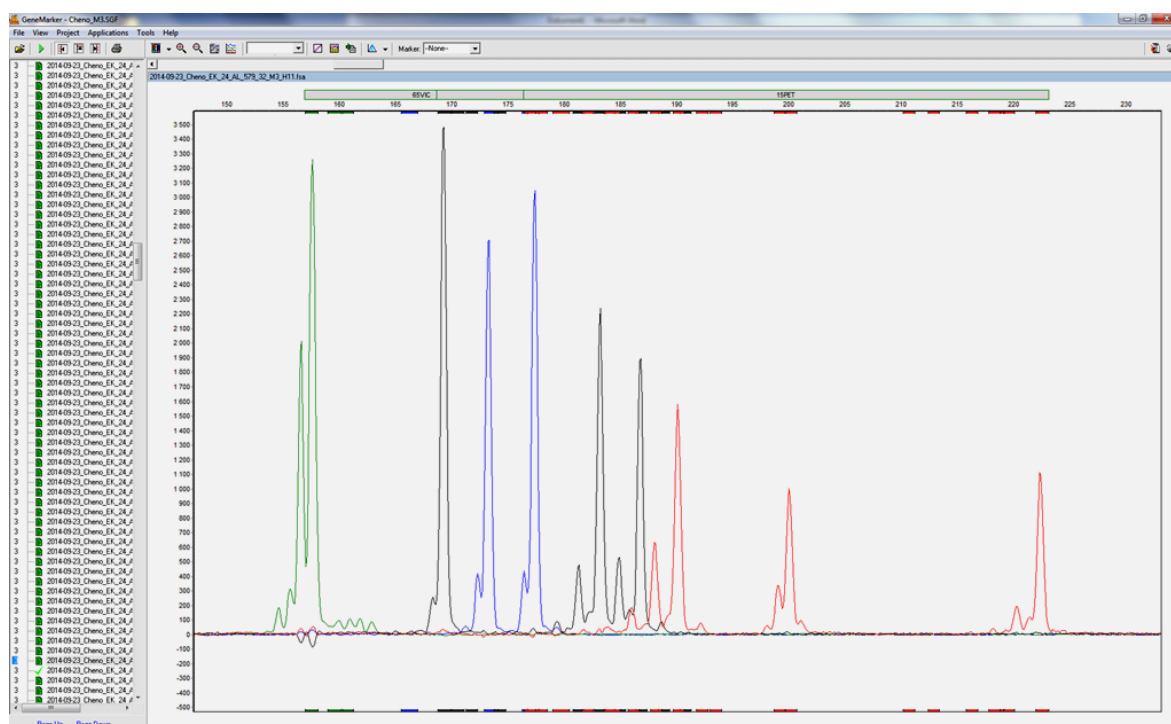
Pro složení multiplex PCR jsem vybrala nejlépe optimalizované značené primery, které při opakované analýze vykazovaly shodný *pattern* a byly variabilní mezi druhy. Při výběru primerů do jedné PCR reakce byla brána v úvahu délka lokusu, kvůli možnému překryvu alel při fragmentační analýze. Multiplexy jsem nejprve optimalizovala na dvou jedincích z každé populace z geograficky vzdálených území (tabulka 3). Při optimalizaci multiplexů jsem měnila koncentraci jednotlivých primerů v jedné reakci, tak aby všechny mikrosatelitové lokusy v multiplexu vykazovaly podobný fluorescenční signál při fragmentační analýze a vzájemně se nerušily. Multiplex PCR pro všechny lokusy probíhala v celkovém objemu 10 μ l za následujících podmínek: Víko cycleru před zahájením reakce bylo zahříváno na 105 °C. DNA byla denaturována 15 min při 95 °C, následovalo 35 cyklů denaturace 95 °C/30 sec, annealingu – nasedání primerů (t_a) 55 °C/30 sec a elongace 72 °C/30 sec. Doba závěrečné elongace byla 30 min při 72 °C. Délky PCR produktů byly zjištěny pomocí fragmentační analýzy, za stejných podmínek jako je popsáno výše. Nakonec jsem sestavila 3 optimalizované multiplexy, z nichž každý obsahoval 4 lokusy, které jsem použila na analýzy 911 jedinců studovaných druhů sebraných na území ČR (tabulka 4). Složení a konečný obsah reagensií v jednotlivých multiplexech je znázorněn v tabulce 7.

Tabulka 7 Sestavené 3 multiplexy pro analýzy s potřebným množstvím reagensií do 1 multiplex PCR při celkovém objemu 10 μ l. První sloupec značí pracovní označení multiplexu, dále je uveden název lokusu, fluorescenční značení primeru, množství primerů, ddH₂O, koncentrovaného QIAGEN Multiplex PCR Master Mixu a studované DNA.

Multiplex	Lokus	Značka	Primery	ddH ₂ O	MM	DNA		
M1	QCA115	6-FAM	0,2 µl	1,4 µl	5 µl	2 µl		
	QCA108	NED	0,2 µl					
	QAAT041	PET	0,2 µl					
	QATG028	VIC	0,2 µl					
M2	QATG035	6-FAM	0,2 µl	1,4 µl			5 µl	2 µl
	QCA046	NED	0,2 µl					
	QATG059	PET	0,2 µl					
	QAAT057	VIC	0,2 µl					
M3	QCA030	6-FAM	0,2 µl	1,2 µl	5 µl	2 µl		
	QCA015	NED	0,2 µl					
	QCA056	PET	0,3 µl					
	QCA029	VIC	0,2 µl					

3.5 HODNOCENÍ MIKROSATELITOVÝCH DAT

Primární data z fragmentační analýzy jsem analyzovala pomocí komerčního programu GeneMarker® 2.4.0 (SoftGenetics). Templát projektu (*Template of the project*) byl zvolen ABI a jako standard (*Size standard*) GeneScan-500 LIZ zobrazovaný oranžovou barvou (neakceptuje píky o délce 35, 250, 340 bází). Typ analýzy jsem nastavila jako analýza rostlinného materiálu (*Fragment Plant*). Každý multiplex jsem odečítala v samostatném projektu (obrázek 3). Pro každý lokus jsem v *Panel Editor* nastavila automatický odečet alel definováním jednotlivých panelů pro každý multiplex nastavením tzv. binů (na zadané pozici automaticky zaznamená přítomnost/nepřítomnost dané alely). Automatický odečet alel jsem manuálně po každém vzorku kontrolovala a případně opravovala. U špatně analyzovaných či vůbec neamplifikovaných vzorků jsem analýzu zopakovala, a pokud vzorek opět nešel vyhodnotit, byl z analýzy vyloučen. Pro věrohodnost získaných dat jsem udělala tzv. odhad chybovosti (*error rate estimate*), kdy jsem náhodně vybrala od každého druhu několik jedinců a provedla u nich opakovanou analýzu. Poté jsem porovnávala výstupy u stejných vzorků a spočítala chybovost při odečtu jednotlivých alel (poměr odlišného počtu alel při srovnání analýz a celkového počtu alel na lokus). Z celkového počtu 911 jedinců jsem na tuto analýzu vybrala 204 jedinců rovnoměrně rozdělených ve 3 multiplexech.



Obrázek 3 Ukázka výstupu z fragmentační analýzy multiplexu (M3) se 4 lokusy v programu GeneMarker® 2.4.0. Na obrázku je vidět 9 alel hexaploidního jedince *Ch. album*. U lokusu QCA030 (modře) detekujeme 2 alely, QCA015 (černě) 3 alely, QCA056 (červeně) 3 alely a QCA029 (zeleně) 1 alelu.

3.5.1 ODHAD GENETICKÉ VARIABILITY MIKROSATELITŮ

Pro počáteční odhad genetické variability mikrosatelitových lokusů, který byl na počátku analýz nezbytný, abych zjistila, zda jsou lokusy použitelné na zodpovězení postulovaných hypotéz v úvodu práce, jsem na tyto analýzy nejprve vybrala jedince z geograficky vzdálených populací (tabulka 3). Poté jsem ty samé analýzy udělala i na populacích nasbíraných na území ČR, které jsem použila i na analýzy odhadu toku genů mezi studovanými druhy (tabulka 4). Z důvodu nemožnosti určení alelických frekvencí u polyploidních jedinců jsem v dalších analýzách nakládala s daty jako s dominantními markery, tj. data měla binární povahu (příloha č. 11 a 12 na CD u diplomové práce). Pro vyhodnocení dat jsem zvolila program FAMD (*Fingerprinting Analysis with Missing Data*; Schlüter and Harris 2006). V sekci *Groups* jsem definovala 5 populací; jedince stejného druhu jsem zařadila do jedné populace. Jedince použité na odhad toku genů mezi studovanými druhy (tabulka 4) jsem ještě rozdělila do populací dle lokalit tj. 5 skupin populací. Pro jednotlivé populace/druhy jsem vypočítala následující statistiky – procento polymorfních lokusů (alel), počet fixovaných, privátních a fixovaných privátních alel. V programu FAMD jsem vypočítala i analýzu molekulární variance (AMOVA) mezi druhy a v rámci druhů, přičemž jsem pro výpočet sekundární matice dat zvolila Jaccardův koeficient (*Jaccard similarity coefficient*; Excoffier et al. 1992).

Pro další výpočty genetické variability jsem vyexportovala datovou matici do R skriptu AFLP.dat (Ehrich 2006) spustitelného v prostředí R 3.1.1 (R Core Team 2014). Tento skript jsem použila pro výpočet vnitropopulační genetické variability (příkaz *Diversity*), který ji počítá dle Neiovy genetické diverzity (*Nei's gene diversity*; Nei 1987) a pro výpočet DW indexu (příkaz *Rarity*) podle Schönswetter a Tribsch (2005). Pro přehled počtu alel na lokus a počet sdílených alel vždy mezi dvěma druhy jsem použila příkaz *Frequencies*, který vygeneroval tabulku obsahující frekvenci každé alely v datovém souboru a příkaz *Presence*, který vypočítal zastoupení dané alely u studovaných druhů.

3.5.2 PCoA (ANALÝZA HLAVNÍCH KOORDINÁT)

Pro zobrazení genetické podobnosti mezi jedinci jsem nejprve zvolila analýzu hlavních koordinát (PCoA = *Principal Coordinates Analysis*). Sekundární matici dat genetických vzdáleností mezi jedinci jsem vytvořila v prostředí R 3.1.1 pomocí R skriptu POLYSAT 1.3-2. Ten byl vyvinutý pro mikrosatelitová data s tím, že umí pracovat se smíšenými polyploidními daty (Clark and Jasieniuk 2011). Do tohoto skriptu jsem načetla primární data vyexportovaná z GeneMarker[®] 2.4.0, založená na odečtu délky jednotlivých alel. V POLYSATu jsem přiřadila jednotlivé jedince k populacím definované příslušností k druhu a lokalitě (celkem 23 populací). Dále jsem u každého jedince zadala počet a název lokusů, délku repetice jednotlivých mikrosatelitů a ploidii. Pro vygenerování matice vzdáleností mezi jedinci, potřebnou pro zobrazení jedinců v dvourozměrném prostoru, jsem zvolila *Lynch distance* (Lynch 1990), která počítá vzdálenost mezi jedinci založenou na binárních datech (přítomnost/nepřítomnost alely na dané pozici). Pro porovnání a objektivní hodnocení výstupu z PCoA jsem ještě zvolila pro tvorbu ordinačního diagramu Jaccardův index podobnosti (*Jaccard index similarity*) za použití programu PAST (Hammer et al. 2001). Do programu PAST jsem načetla primární matici dat z GeneMarkeru. *Lynch distance* a *Jaccard index similarity* jsem pro tuto analýzu shledala jako nejvhodnější kvůli nemožnému určení přesných alelických frekvencí a neznámému typu dědičnosti. Matici vzdáleností spolu s procenty variability pro každou osu jsem vyexportovala do programu Excel (MS Office, 2007), který jsem použila k vizualizaci dat. Zde jsem udělala dvourozměrný bodový graf (ordinační diagram), kde byli jedinci zobrazeni dle druhové příslušnosti a poté jsem vytvořila 5 grafů zobrazujících vztahy mezi jedinci na jednotlivých lokalitách.

3.5.3 TVORBA FYLOGENETICKÉHO STROMU

Pro komplexní zobrazení vztahů mezi 911 jedinci z 23 populací jsem vytvořila nezakořeněný fylogenetický strom vizualizovaný a upravený v programu FigTree 1.4.2, který je volně dostupný z <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>. Fylogenetický strom jsem vytvořila metodou *Neighbour-joining* na základě Jaccardova koeficientu (*Jaccard similarity coefficient*) v programu FAMD (Schlüter and Harris 2006).

3.5.4 STRUCTURE (URČENÍ GENETICKÉ STRUKTURY POPULACÍ)

Pro zjištění struktury populací jsem použila program STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard et al. 2000), který umí pracovat se smíšenými kodominantními polyploidními daty (Falush et al. 2003, 2007). Vstupní soubor jsem vygenerovala pomocí R skriptu POLYSAT 1.3-2 (viz výše), který na základě defaultního algoritmu dopočítává alelické frekvence v polyploidních datech (Clark and Jasieniuk 2011). Kvůli výpočetní náročnosti byl program STRUCTURE spuštěn v rozhraní MetaCentra české Národní Gridové Infrastruktury provozované v rámci programu: *Projects of Large Infrastructure for Research, Development, and Innovations* (LM2010005). Do tohoto rozhraní jsem nahrála vstupní soubor spolu s dávkovým souborem a joblistem, které jsou pro výpočet nezbytné, protože definují parametry jednotlivých analýz (Hubisz et al. 2009).

Nejprve jsem do analýzy zahrнула všech 911 jedinců s 12 lokusy. Pro analýzu jsem použila *admixture model with correlated allele frequencies*, který uvažuje, že jedinci mohou mít společný původ a mohou sdílet nějakou část svého genomu, tudíž frekvence alel v různých populacích mohou být podobné. Dále jsem použila model s recesivními alelami, který je schopen analyzovat polyploidní data bez znalosti alelických frekvencí (Falush et al. 2003). Parametry analýzy jsem nastavila následovně: Počet generací řetězce (*Length of Burnin Period*) byl nastaven na 100 000 kroků a počet generací běhu (*Number of MCMC Reps after Burnin*) na 1 000 000 kroků. Rozpětí počtu skupin (= genetických klastrů), které jsem analyzovala (tzv. K), odpovídalo počtu analyzovaných populací. Počet nezávislých běhů (tzv. *run*) pro jednotlivá K (*Number of Iteration*) byl nastaven 10.

Pro další analýzy jsem rozdělila jedince po jednotlivých ploidních úrovních tj. v programu STRUCTURE jsem analyzovala samostatně diploidní jedince (*Ch. ficifolium*, *Ch. suecicum*), tetraploidní jedince (*Ch. strictum*, *Ch. striatiforme*) a hexaploidní jedince (*Ch. album* s. str.). Až na uvedené výjimky byly parametry analýzy nastaveny stejně jako v předchozí analýze: Počet generací řetězce = 25 000, počet generací běhu = 100 000, rozpětí počtu skupin: K = 1–10 (pro diploidní jedince), K = 1–8 (pro tetraploidní jedince), K = 1–5 (pro hexaploidní jedince).

Pro zjištění struktury populací na jednotlivých lokalitách jsem udělala analýzu pro každou lokalitu zvlášť (tzn. 5 samostatných analýz). Parametry byly opět nastaveny stejně až na uvedené výjimky: Počet generací řetězce = 100 000, počet generací běhu = 1 000 000, rozpětí počtu skupin (K) = 1–5.

Pro zpracování výstupů z programu STRUCTURE jsem zvolila R skript STRUCTURE-sum-2009 (Ehrich et al. 2007) spustitelný v prostředí R 3.1.1 (R Core Team 2014). Pomocí příkazu *Structure.table* jsem spočítala pravděpodobnost *likelihood* modelu $[\ln P(D)]$ pro určení optimálního počtu K a pomocí příkazu *Structure.simil* jsem získala koeficient podobnosti mezi jednotlivými opakováními v rámci K (Nordborg et al. 2005). Pro zjištění optimálního počtu skupin (= genetických klastřů) jsem použila příkaz *Structure.deltaK* (Evano et al. 2005).

Dále jsem data zpracovala v programu CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson and Rosenberg 2007) kde jsem udělala tzv. *alignment* všech běhů pro dané K, tj. zprůměrovala jsem všechny běhy pro dané K, které vykazovaly nižší hodnoty koeficientu podobnosti než 1. Pro vizualizaci výsledků jsem následně použila program DISTRICT 1.1 (Rosenberg 2004). Pro zobrazení sloupcového diagramu populací jsem výstupní soubor s koncovkou *.ps překonsovertovala do formátu PDF.

4 VÝSLEDKY

4.1 CROSS-AMPLIFIKACE A GENETICKÁ VARIABILITA MIKROSATELITŮ

4.1.1 CROSS-AMPLIFIKACE A MULTIPLEX PCR

Prvním krokem diplomové práce bylo získat funkční set mikrosatelitových markerů pro všechny studované druhy, který bude následně využit k testování postulovaných hypotéz. Z celkového počtu 68 testovaných mikrosatelitových lokusů, se mi jich na všechny studované druhy podařilo přenést 24 (příloha č. 1). Ty byly dále sestavovány do multiplexů. Závěrem jsem vybrala 12 dostatečně variabilních mikrosatelitových lokusů sestavených do 3 multiplexů, z nichž každý obsahoval 4 lokusy (tabulka 8). Při testování variability na větším počtu jedinců z geograficky širšího území (tabulka 3) se lokus QAAT057 a QATG028 ukázal jako specifický pro *Ch. ficifolium*. Zbývajících 10 lokusů se amplifikovalo u všech studovaných druhů. Při opakované analýze 204 náhodně vybraných jedinců napříč druhy z pěti lokalit sebraných na území ČR a použitých na analýzy odhadu toku genů mezi studovanými druhy (tabulka 4), byly všechny lokusy amplifikovány shodně u všech jedinců, a tudíž byl *error rate estimate* pro všechny druhy 0 %. Absolutní stabilita jednotlivých lokusů při opakovaných analýzách, tak ukázala na jejich vysokou spolehlivost. Složení multiplexů spolu s rozsahem délek detekovaných alel ze studie zahrnující 142 jedinců (tabulka 3) a také ze sběru na území ČR zahrnující 911 jedinců (tabulka 4), stejně tak jako koncentrace důležitých reagensů PCR, jsem shrnula v tabulce 8. V tabulce 9 jsem uvedla reakční podmínky PCR, které jsem optimalizovala pro jednotlivé cross-amplifikované mikrosatelitové lokusy studovaných druhů.

Tabulka 8 Cross-amplifikované mikrosatelitové lokusy sestavené do 3 multiplexů (M1, M2, M3). První sloupec obsahuje název multiplexu, následuje název lokusů (Mason et al. 2005), motiv repetice mikrosatelitů, fluorescenční značení primerů, rozsah délek detekovaných alel u vzorků z geograficky vzdálených populací (1; tabulka 3) a ze sběru na území ČR (2; tabulka 4), procento chybovosti odečtu alel při opakované analýze, koncentrace primerů a templátové DNA pro PCR reakci.

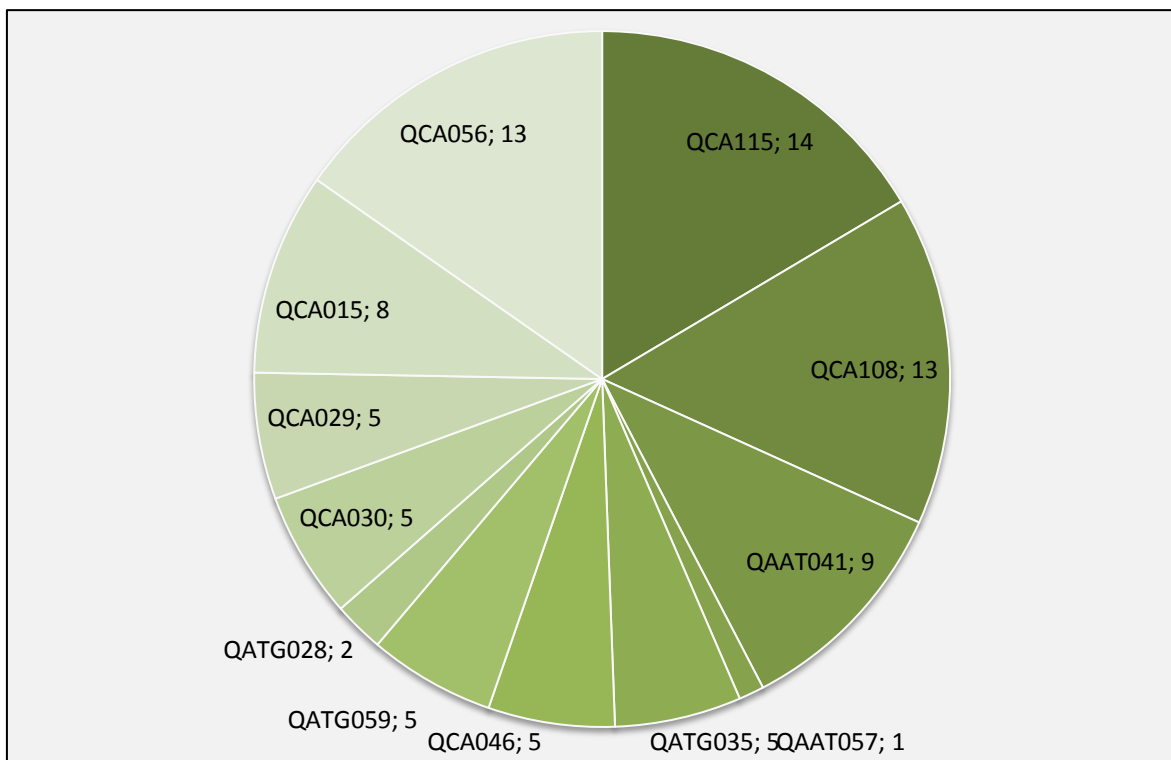
Multiplex	Lokus	Repetice	Značka	Rozsah délek alel (1)	Rozsah délek alel (2)	Chybovost odečtu alel	Primery	DNA
M1	QCA115	(CA) ₁₃	6-FAM	89–227	89–210	0 %	0,2 μM	30 ng
	QCA108	(TG) ₄	NED	174–316	142–344		0,2 μM	
	QAAT041	(ATT) ₈	PET	114–335	114–400		0,2 μM	
	QATG028	(ATG) ₈	VIC	204–207	204–207		0,2 μM	
M2	QATG035	(GAT) ₁₂	6-FAM	169–179	169–182		0,2 μM	
	QCA046	(CA) ₁₈	NED	142–160	142–155		0,2 μM	
	QATG059	(CAT) ₆	PET	145–161	145–164		0,2 μM	
	QAAT057	(AAT) ₁₄	VIC	197	197		0,2 μM	
M3	QCA030	(CA) ₁₃	6-FAM	166–178	166–178		0,2 μM	
	QCA015	(AC) ₁₇	NED	169–196	169–191		0,2 μM	
	QCA056	(TG) ₁₃	PET	168–223	178–223		0,3 μM	
	QCA029	(CA) ₁₀	VIC	158–161	158–161		0,2 μM	

Tabulka 9 Reakční podmínky PCR pro cross-amplifikované lokusy studovaných druhů.

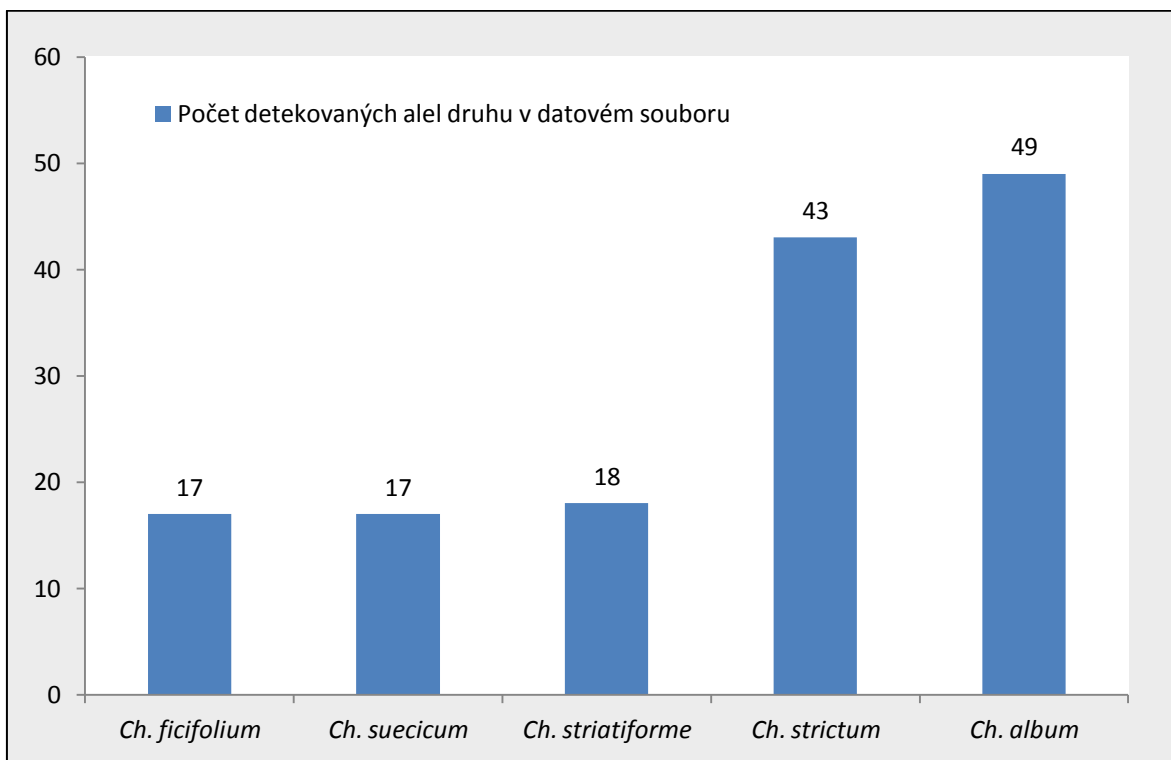
95 °C	15 min	} 35×
95 °C	30 sec	
55 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	30 min	
4 °C	∞	

4.1.2 GENETICKÁ VARIABILITA A DIVERZITA CROSS-AMPLIFIKOVANÝCH MIKROSATELITŮ

Pro zjištění genetické variability přenesených mikrosatelitových lokusů jsem ke stanovení základních parametrů do analýzy zahrnula 142 jedinců z geograficky vzdálených lokalit (tabulka 3) rozdělených do 5 populací dle druhové příslušnosti. V tomto datovém souboru jsem celkem odečetla 85 alel rozložených do 12 lokusů (obrázek 4). Nejvíce alel jsem odečetla u hexaploidního druhu *Ch. album* a u tetraploidních druhů, které měly přibližně o polovinu více alel než jedinci diploidních druhů (obrázek 5). Pro mnoho jedinců odlišných druhů jsem detekovala více společných alel, přičemž nejvíce sdílených alel měly hexaploidní a tetraploidní druhy (příloha č. 2).



Obrázek 4 Grafické znázornění zastoupení alel v jednotlivých lokusech odečtených na základě mikrosatelitových dat 142 jedinců (tabulka 3) hodnocených jako binární data. Jednotlivé výseče znázorňují procentuelní podíl odečtených alel v daném lokusu vůči celému datovému souboru čítající 85 alel.



Obrázek 5 Grafické znázornění zastoupení alel u studovaných druhů rodu *Chenopodium* odečtených na základě mikrosatelitových dat 142 jedinců (tabulka 3) hodnocených jako binární data. Na obrázku můžeme vidět přibližně o polovinu více detekovaných alel u polyploidních druhů. Malý počet alel u *Ch. striatiforme* je zde pravděpodobně dán zastoupením pouze 9 jedinců v analýze.

Analýza molekulární variance (AMOVA) odhalila mezi druhy velké procento variability (80 %), přičemž souhrnná variabilita uvnitř všech druhů je poměrně nízká (20 %). Nejvíce polymorfních lokusů jsem zaznamenala u hexaploidního a tetraploidních druhů, které také mezi sebou sdílely nejvíce alel. Privátní fixované alely, které se vyskytují u všech jedinců daného druhu, ale jiný druh je nemá, jsem zaznamenala pouze u diploidních druhů *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum* (tabulka 10).

Tabulka 10 Základní genetické parametry pro 142 jedinců studovaných druhů (tabulka 3) vygenerované programem FAMD (Schlüter and Harris 2006) na základě binární matice dat. Pro výpočet analýzy molekulární variance (AMOVA) jsem použila Jaccardův koeficient. Populace jsem rozdělila dle druhů (5 populací = 5 druhů).

Počet jedinců	142
Počet detekovaných alel	85
Velikost matice	12 070
Chybějící data	2,73 %
AMOVA	%
Variabilita mezi druhy	80
Variabilita uvnitř druhů	20
Počet polymorfních lokusů (alel) u daného druhu	Počet
Celý datový soubor	82
<i>Ch. ficifolium</i>	10
<i>Ch. suecicum</i>	15
<i>Ch. striatiforme</i>	4
<i>Ch. strictum</i>	40
<i>Ch. album</i>	45
Počet alel přítomných u všech jedinců daného druhu	Počet
<i>Ch. ficifolium</i>	8
<i>Ch. suecicum</i>	5
<i>Ch. striatiforme</i>	16
<i>Ch. strictum</i>	5
<i>Ch. album</i>	6
Počet alel vyskytující se pouze u daného druhu	Počet
<i>Ch. ficifolium</i>	7
<i>Ch. suecicum</i>	8
<i>Ch. striatiforme</i>	1
<i>Ch. strictum</i>	14
<i>Ch. album</i>	17
Počet alel vyskytující se u všech jedinců daného druhu a u jiného ne	Počet
<i>Ch. ficifolium</i>	3
<i>Ch. suecicum</i>	2
<i>Ch. striatiforme</i>	0
<i>Ch. strictum</i>	0
<i>Ch. album</i>	0

Rozdíly v genetické diverzitě spočítané pomocí Neiovy genetické diverzity (Nei 1987) potvrdily nízkou genetickou diverzitu uvnitř druhů a mezi druhy se hodnoty lišily o řád ve spojitosti se stoupající ploidii (tabulka 11). Největší rozdíl byl mezi diploidními a polyploidními druhy, přičemž výjimku tvořil druh *Ch. striatiforme*, což bylo v tomto případě způsobeno malým počtem analyzovaných jedinců sebraných pouze z jedné populace. Rozdíly průměrných hodnot DW indexu (Schönswetter and Tribsch 2005) byly mezi diploidními a polyploidními druhy přibližně trojnásobné (tabulka 11). Nejmenších hodnot dosahoval druh *Ch. suecicum* (0,31), nejvyšších naopak *Ch. album* (0,92).

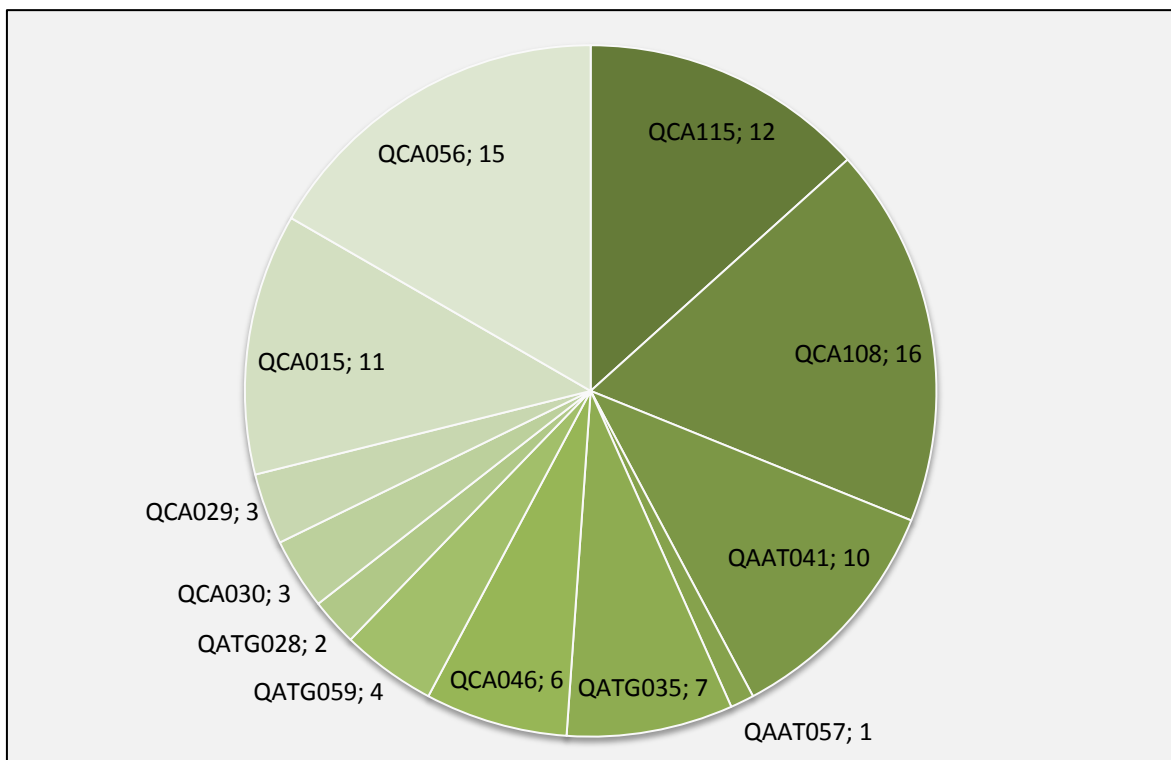
Tabulka 11 Souhrnná tabulka indexů diverzity mezi studovanými druhy pro 142 jedinců (tabulka 3) rodu *Chenopodium* spočítané pomocí R skriptu AFLP.dat (Ehrich 2006) na základě binární matice dat. V tabulce je uveden název druhu, počet jedinců daného druhu, proporce variabilních lokusů, Neiův index genetické diverzity, 95% interval spolehlivosti a index vzácnosti (DW index).

Druh	Počet jedinců	Proporce variabilních lokusů	Index diverzity (Nei)	95% interval spolehlivosti spodní – horní hodnota	DW index
<i>Ch. ficifolium</i>	34	0,12	0,03	0,01 – 0,05	0,33
<i>Ch. suecicum</i>	36	0,14	0,03	0,01 – 0,06	0,31
<i>Ch. striatiforme</i>	9	0,02	0,01	0 – 0,02	0,52
<i>Ch. strictum</i>	28	0,46	0,15	0,11 – 0,2	0,81
<i>Ch. album</i>	35	0,51	0,14	0,11 – 0,18	0,92

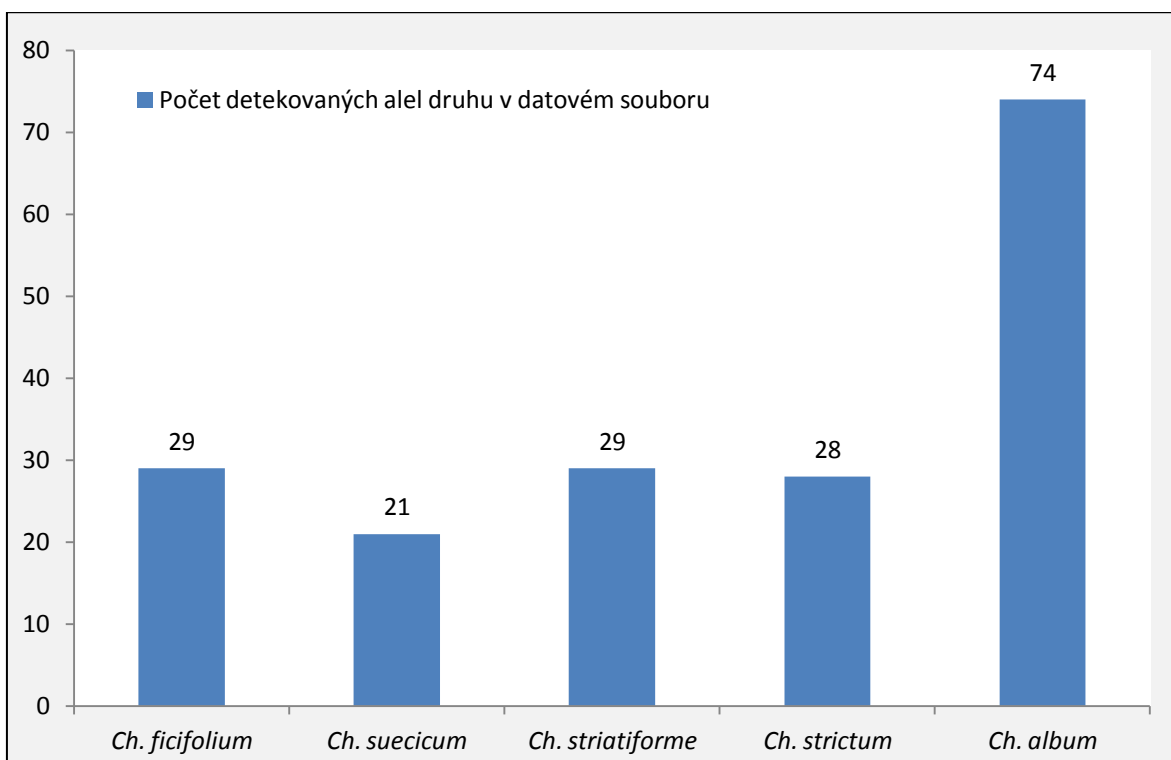
4.2 GENETICKÁ DIVERZITA STUDOVANÝCH DRUHŮ NA 5 VYBRANÝCH LOKALITÁCH

Genetickou diverzitu studovaných druhů skupiny *Ch. album* na pěti vybraných lokalitách na území České republiky jsem odhadovala pomocí mikrosatelitových markerů. Do analýzy jsem zahrnula 911 jedinců z pěti odlišných lokalit v rámci ČR (tabulka 4). Jedince stejného druhu jsem přiřadila do jedné populace, tudíž pro tyto analýzy bylo bráno 5 druhů = 5 populací. Celkem jsem odečetla 90 alel na 12 lokusech. Nejvíce alel jsem detekovala v případě lokusu QCA108 (16 alel) a naopak nejméně alel u lokusu QAAT057, kde jsem zaznamenala pouze jednu alelu (obrázek 6). Mezi diploidními a tetraploidními druhy byl počet alel velmi podobný. Oproti tomu u hexaploidního druhu *Ch. album* byl počet alel o více než polovinu vyšší oproti diploidním a tetraploidním druhům, tedy 74 alel (obrázek 7). Mezi polyploidními druhy jsem detekovala mnoho společných alel, přičemž nejvíce jich sdílely tetraploidní druh *Ch. striatiforme* a hexaploidní druh *Ch. album*, celkem 27 alel. Naopak nejméně společných alel jsem zaznamenala mezi dvojicemi druhů *Ch. suecicum* – *Ch. striatiforme* a *Ch. suecicum* – *Ch. strictum*, které sdílely pouze 4 alely (příloha č. 3). Fixované alely (tzn. alely vyskytující se u všech jedinců daného druhu) se vyskytovaly u všech druhů kromě *Ch. suecicum*. Co se týče privátních alel (tzn. alel, nacházejících se u jedinců pouze daného druhu), nedetekovala jsem žádnou u tetraploidního druhu *Ch. striatiforme* a naopak u hexaploidního druhu *Ch. album* jsem jich detekovala 24. Alely, které se vyskytovaly u všech jedinců stejného druhu, ale nenacházely se u jiných druhů (tzn. fixované privátní alely), byly velmi vzácné. Zaznamenala jsem pouze jednu alelu u diploidního druhu *Ch. ficifolium*. U ostatních druhů se žádná privátní fixovaná alela nenacházela (tabulka 12).

Analýza molekulární variance (AMOVA) ukázala, že značná část variability připadá na mezidruhovou diferenciaci (85,5 %), přičemž souhrnná variabilita uvnitř všech druhů byla nízká (14,5 %; tabulka 12).



Obrázek 6 Grafické znázornění zastoupení počtu alel v jednotlivých lokusech 5 studovaných druhů ze skupiny *Chenopodium album* odečtených na základě mikrosatelitových dat 911 jedinců (tabulka 4) hodnocených jako binární data. Jednotlivé výše znázorňují procentuelní podíl odečtených alel v daném lokusu vůči celému datovému souboru čítající 90 alel.



Obrázek 7 Grafické znázornění zastoupení počtu alel u studovaných druhů rodu *Chenopodium* odečtených na základě mikrosatelitových dat 911 jedinců (tabulka 4) hodnocených jako binární data. Na obrázku můžeme vidět přibližně stejný počet alel u diploidních a tetraploidních druhů a výrazně vyšší počet alel u hexaploidního druhu *Ch. album*.

Tabulka 12 Základní genetické parametry studovaných druhů rodu *Chenopodium* vygenerované programem FAMD (Schlüter and Harris 2006) na základě binární matice dat 911 jedinců z 5 studovaných lokalit na území ČR (tabulka 4). Pro výpočet analýzy molekulární variance (AMOVA) jsem použila Jaccardův koeficient. Populace jsem definovala podle druhové příslušnosti (tzn. 5 populací = 5 druhů).

Počet jedinců	911
Počet detekovaných alel	90
Velikost matice	81 990
Chybějící data	2,76 %
AMOVA	%
Variabilita mezi druhy	85,5
Variabilita v rámci daného druhu	14,5
Počet polymorfních lokusů (alel) u daného druhu	Počet
Celý datový soubor	90
<i>Ch. ficifolium</i>	28
<i>Ch. suecicum</i>	23
<i>Ch. striatiforme</i>	28
<i>Ch. strictum</i>	30
<i>Ch. album</i>	75
Počet alel, které byly u všech jedinců daného druhu	Počet
<i>Ch. ficifolium</i>	1
<i>Ch. suecicum</i>	0
<i>Ch. striatiforme</i>	4
<i>Ch. strictum</i>	1
<i>Ch. album</i>	2
Počet alel vyskytující se pouze u daného druhu	Počet
<i>Ch. ficifolium</i>	4
<i>Ch. suecicum</i>	2
<i>Ch. striatiforme</i>	0
<i>Ch. strictum</i>	5
<i>Ch. album</i>	24
Počet alel vyskytující se u všech jedinců daného druhu a nikde jinde	Počet
<i>Ch. ficifolium</i>	1
<i>Ch. suecicum</i>	0
<i>Ch. striatiforme</i>	0
<i>Ch. strictum</i>	0
<i>Ch. album</i>	0

Hodnoty Neiovy genetické diverzity (Nei 1987) ukázaly nízkou diverzitu v rámci jednotlivých druhů. Rozdíly v hodnotách diverzity mezi druhy se lišily o řád v závislosti na ploidii. Nejméně diverzifikované byly diploidní druhy, poté následovaly druhy tetraploidní a nejvyšších hodnot dosahoval hexaploidní druh *Ch. album* (tabulka 13). Rozdíly průměrných hodnot DW indexu (Schönswetter and Tribsch 2005) byly mezi diploidními a polyploidními druhy přibližně dvoj až trojnásobné. Nejnižších hodnot dosahoval druh *Ch. suecicum* (0,04), nejvyšších pak druh *Ch. album* (0,16). Hodnoty DW indexu u druhů stejné ploidní úrovně byly téměř shodné (tabulka 13).

Tabulka 13 Souhrnná tabulka indexů diverzity mezi druhy pro 911 jedinců (tabulka 4) jednotlivých druhů rodu *Chenopodium* spočítané pomocí R skriptu AFLP.dat (Ehrich 2006) na základě binární matice dat. V tabulce je uveden název druhu, počet jedinců daného druhu, proporce variabilních lokusů, Neiův index genetické diverzity, 95% interval spolehlivosti a index vzácnosti (DW index).

Druh	Počet jedinců	Proporce variabilních lokusů	Index diverzity (Nei)	95% interval spolehlivosti spodní – horní hodnota	DW index
<i>Ch. ficifolium</i>	205	0,32	0,03	0,02 – 0,06	0,06
<i>Ch. suecicum</i>	243	0,23	0,04	0,02 – 0,06	0,04
<i>Ch. striatiforme</i>	91	0,28	0,06	0,03 – 0,09	0,12
<i>Ch. strictum</i>	85	0,31	0,07	0,04 – 0,1	0,15
<i>Ch. album</i>	287	0,82	0,12	0,09 – 0,15	0,16

4.2.1 GENETICKÁ DIVERZITA MEZI LOKALITAMI

Alelická diverzita mezi lokalitami, kde jsem na každé lokalitě jednotlivé druhy zařadila do populace (tzn. 1 druh = 1 populace), byla velmi podobná a na jednotlivých lokalitách byla značně vysoká (tabulka 14). Z 90 detekovaných alel se počet alel pohyboval v rozmezí 64–76 na lokalitu. Nejméně alel jsem detekovala u druhu *Ch. ficifolium* na lokalitě Podbořany (1 alela). Naopak nejvíce alel měl druh *Ch. album* na lokalitě Hostivice a Vrané nad Vltavou (58 alel). Pro žádnou lokalitu jsem nenašla žádnou privátní či fixovanou alelu. Nejméně privátních alel měl druh *Ch. ficifolium* na lokalitě Vrané nad Vltavou, kde jsem zaznamenala pouze jednu, naopak nejvíce jich měl druh *Ch. strictum* v rámci lokality Praha 7, kde jsem jich zaznamenala 16. Detekovala jsem jedinou fixovanou alelu v rámci druhu *Ch. album* na lokalitě Velký Rohozec.

Tabulka 14 Genetická variabilita mezi 5 studovanými lokalitami vygenerovaná programem FAMM (Schlüter and Harris 2006) na základě binární matice mikrosatelitových dat. Definovala jsem 5 skupin populací (= 5 lokalit) a na každé lokalitě jsem určila populace dle druhové příslušnosti (= 5 populací na lokalitu).

Lokalita (skupina populací)/druh (populace)	Praha 7	Podbořany	Velký Rohozec	Hostivice	Vrané nad Vltavou
Počet polymorfních lokusů (alel) na lokalitě	72	72	64	70	76
<i>Ch. ficifolium</i>	19	1	14	10	13
<i>Ch. suecicum</i>	13	13	10	18	12
<i>Ch. striatiforme</i>	17	10	–	14	23
<i>Ch. strictum</i>	8	18	–	35	22
<i>Ch. album</i>	57	48	51	58	58
Počet alel u všech jedinců na dané lokalitě	0	0	0	0	0
<i>Ch. ficifolium</i>	3	10	4	4	1
<i>Ch. suecicum</i>	4	3	8	0	4
<i>Ch. striatiforme</i>	12	15	–	13	6
<i>Ch. strictum</i>	16	11	–	9	2
<i>Ch. album</i>	5	8	5	2	2
Počet alel vyskytující se pouze na dané lokalitě	0	0	0	0	0
<i>Ch. ficifolium</i>	0	0	0	0	0
<i>Ch. suecicum</i>	0	0	0	0	0
<i>Ch. striatiforme</i>	0	0	–	0	0
<i>Ch. strictum</i>	0	0	–	0	0
<i>Ch. album</i>	0	0	1	0	0
Počet alel u všech jedinců na lokalitě a jinde ne	0	0	0	0	0
<i>Ch. ficifolium</i>	0	0	0	0	0
<i>Ch. suecicum</i>	0	0	0	0	0
<i>Ch. striatiforme</i>	0	0	–	0	0
<i>Ch. strictum</i>	0	0	–	0	0
<i>Ch. album</i>	0	0	0	0	0

Rozdíly v genetické diverzitě spočítané pomocí Neiovy genetické diverzity (Nei 1987) ukázaly téměř identickou a nízkou diverzitu mezi jednotlivými lokalitami (0,19–0,23). Průměrné hodnoty DW indexu (Schönswetter and Tribsch 2005) opět ukázaly na téměř shodnou divergenci mezi lokalitami, která je taktéž nízká (tabulka 15).

Tabulka 15 Souhrnná tabulka s indexy diverzity mezi studovanými lokalitami spočítané pomocí R skriptu AFLP.dat (Ehrich 2006) na základě binární matice mikrosatelitových dat. V tabulce je uveden název lokality, počet jedinců na lokalitě, proporce variabilních lokusů, Neiův index genetické diverzity, 95% interval spolehlivosti a index vzácnosti (DW index).

Lokalita	Počet jedinců	Proporce variabilních lokusů	Index diverzity (Nei)	95% interval spolehlivosti spodní – horní hodnota	DW index
Praha 7	196	0,88	0,23	0,19 – 0,26	0,11
Podbořany	163	0,79	0,23	0,19 – 0,27	0,1
Velký Rohozec	150	0,71	0,19	0,15 – 0,23	0,09
Hostivice	184	0,78	0,22	0,18 – 0,25	0,09
Vrané nad Vltavou	218	0,84	0,22	0,18 – 0,25	0,1

4.3 GENETICKÁ STRUKTURA POPULACÍ

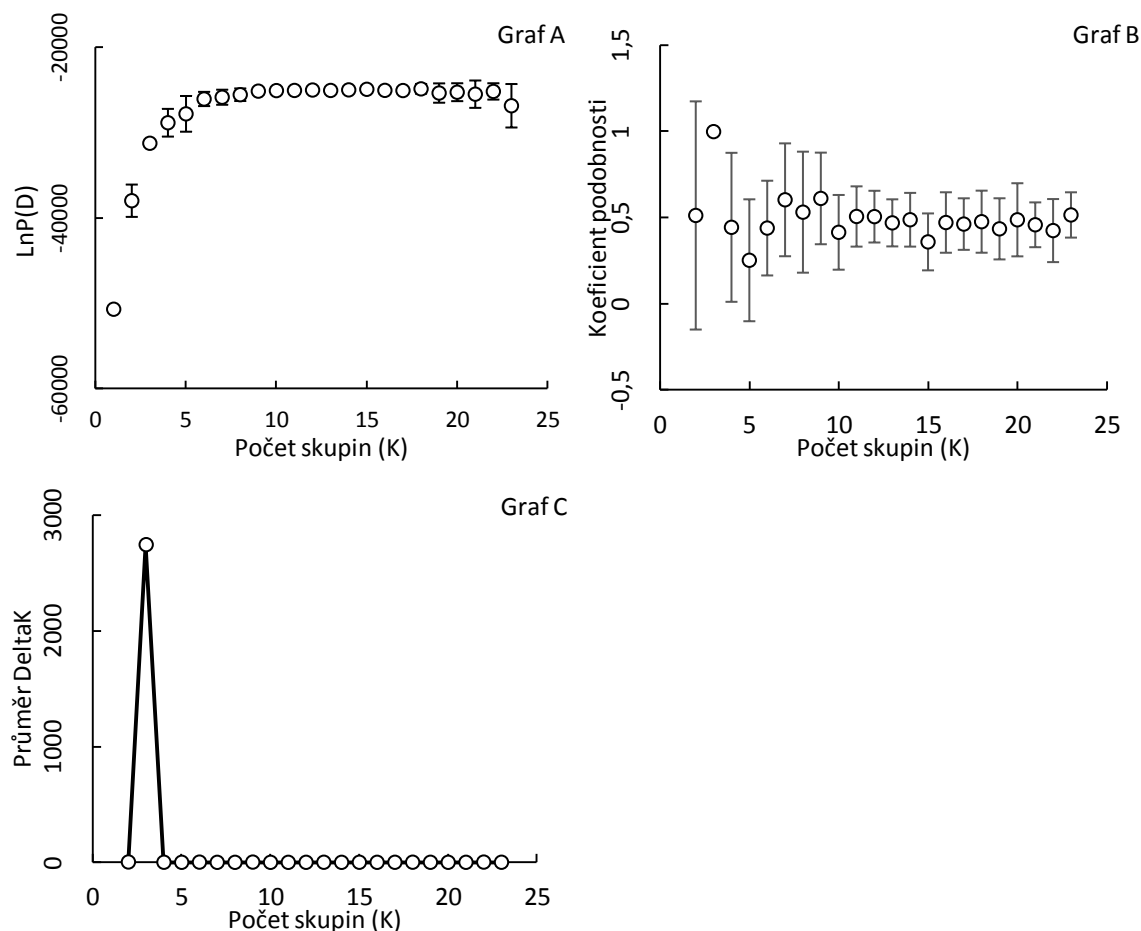
4.3.1 O PŮVODU *CHENOPODIUM ALBUM*

Za účelem stanovení genetické struktury v celém datovém souboru z pěti studovaných lokalit (celkem 23 populací; tabulka 4) a pro odhalení vztahů mezi studovanými druhy jsem použila program STRUCTURE. Na obrázku 8 je vidět, že analýza ukázala nejoptimálnější rozdělení populací do 3 genetických klastrů (dále jen klastrů; $K = 3$). Na obrázku 8 (graf A), který znázorňuje pravděpodobnost modelu ($\text{LnP}(D)$) se vzrůstajícím počtem klastrů (K) je patrné, že od bodu pro $K = 3$ dochází k narovnávání křivky. Obrázek 8 (graf B) znázorňující podobnost mezi jednotlivými běhy ukázal nejvyšší koeficient podobnosti pro $K = 3$, který je 1. Populace tedy byly zařazeny do těchto 3 klastrů se 100% pravděpodobností. Průměr hodnot ΔK na obrázku 8 (graf C) ukázal také nejvyšší hodnotu pro $K = 3$.

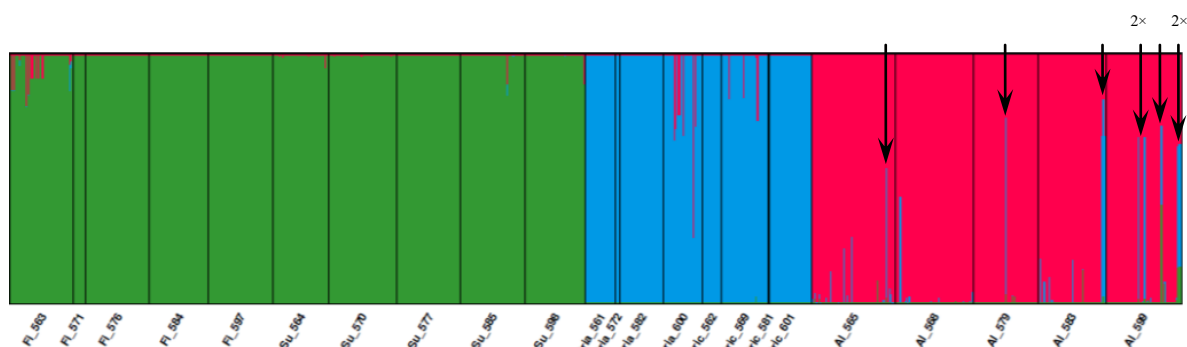
Grafická vizualizace výstupu z programu STRUCTURE je vidět na obrázku 9. Na sloupcovém diagramu je patrné rozdělení populací do 3 klastrů podle stupně ploidie. Diploidní populace (zeleně) *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum* vytvořily první klast, u nichž můžeme pozorovat na několika jedincích příměs klastru z hexaploidní skupiny populací (červeně). Tetraploidní populace (modře) *Ch. striatiforme* a *Ch. strictum* vytvořily druhý klast, kde opět pozorujeme u několika jedinců příměs klastru z hexaploidní skupiny populací. V těchto případech se ovšem jednalo pravděpodobně o artefakty způsobené sdílením mnoha společných alel mezi druhy. Třetí klast (červeně) vytvořily hexaploidní populace pravděpodobně dávného křížence *Ch. album*. V tomto červeném klastru jsem detekovala několik jedinců, kteří sdílejí jak zelený klast diploidní skupiny populací, tak modrý klast tetraploidní skupiny populací, což pravděpodobně představuje recentně vzniklé hexaploidní hybridní jedince (na obrázku 9 označení šipkou). Na lokalitě Praha 7 to byl jedinec Al_565_62. Jeden jedinec Al_579_32 byl detekován na lokalitě Velký Rohozec a na lokalitě Hostivice jedinec Al_583_52. Na lokalitě Vrané nad Vltavou jsem určila nejvíce recentně vzniklých kříženců: Al_599_32, Al_599_37, Al_599_49, Al_599_58 a Al_599_59. Poslední skupinu tvoří jedinci, kteří sdílejí alespoň z malé části buď modrý klast z tetraploidní skupiny populací, nebo pouze zelený klast z diploidní skupiny populací. V tomto případě se tak pravděpodobně jedná o křížence vzniklé hybridizací dávných kříženců, kteří mají pouze červený klast a recentně vzniklých kříženců, kteří sdílejí jak diploidní, tak i tetraploidní klast. Na lokalitě Praha 7 to byli

jedinci: Al_565_1, Al_565_10, Al_565_2, Al_565_23, Al_565_35, Al_565_38, Al_565_40, Al_565_59, Al_565_9, Al_565_65 a Al_565_66. Na lokalitě Podbořany: Al_568_14, Al_568_19, Al_568_20, Al_568_41 a Al_568_9. Na lokalitě Velký Rohozec: Al_579_37 a Al_579_39. Na lokalitě Hostivice: Al_583_11, Al_583_14, Al_583_18, Al_583_2, Al_583_34, Al_583_41, Al_583_51, Al_583_53 a na lokalitě Vrané nad Vltavou: Al_599_36, Al_599_39, Al_599_41, Al_599_4. Našla jsem zde ještě několik jedinců s diploidním (zeleným) a tetraploidním (modrým) klastrem, ovšem jejich podíl vůči červenému klastru byl tak malý, že můžeme uvažovat pouze o zařazení těchto jedinců ke křížencům vzniklých hybridizací dávných kříženců s recentně vzniklými kříženci. Těmito jedinci byli na lokalitě Praha 7: Al_565_12 a Al_565_15 a na lokalitě Vrané nad Vltavou: Al_599_51, Al_599_52 a Al_599_9.

Z výsledků analýzy pomocí STRUCTURE lze tedy tvrdit, že recentně vzniklí hexaploidní kříženci *Ch. album*, které jsem detekovala, vznikli hybridizací diploidního a tetraploidního druhu, bohužel kvůli rozdělení populací do klastrů dle ploidní úrovně a ne podle druhové příslušnosti, jsem nemohla přesně určit druhy, které se na této hybridizaci podílely.



Obrázek 8 Analýza jednotlivých běhů pro celý datový soubor 911 jedinců v programu STRUCTURE vyhodnocená pomocí STRUCTURE-sum-2009. Graf A znázornil pravděpodobnost modelu ($\ln P(D)$, osa y) se vzrůstajícím počtem $K = 1-23$ (osa x). Ideální počet genetických klastřů je 3 ($K = 3$). Graf B vyjádřil koeficient podobnosti (osa y) mezi jednotlivými běhy pro dané $K = 2-23$ (osa x). Nejvyšší koeficient podobnosti má zde $K = 3$. Graf C vyjádřil optimální počet genetických klastřů (osa x) pomocí ΔK (osa y) pro dané $K = 2-23$. Optimální rozdělení populací je do 3 genetických klastřů.



Obrázek 9 Sloupcový diagram vytvořený v programu DISTRUCT znázorňující genetickou strukturu 911 jedinců (23 populací – číslo pod diagramem) rozdělených do 3 genetických klastřů, které jsem vyhodnotila pro zobrazení struktury jako neoptimálnější na základě analýzy mikrosatelitových dat v programu STRUCTURE. První genetický klastř (zeleně) znázornil diploidní populace *Ch. ficifolium* (Fi) a *Ch. suecicum* (Su), druhý genetický klastř (modře) tetraploidní populace *Ch. striatiforme* (Stria) a *Ch. strictum* (Stric) a třetí genetický klastř (červeně) hexaploidní populace *Ch. album* (Al). U některých jedinců vidíme, že obsahují příměs z jiného genetického klastřu. Šipky označují recentně vzniklé křížence *Ch. album* (8×).

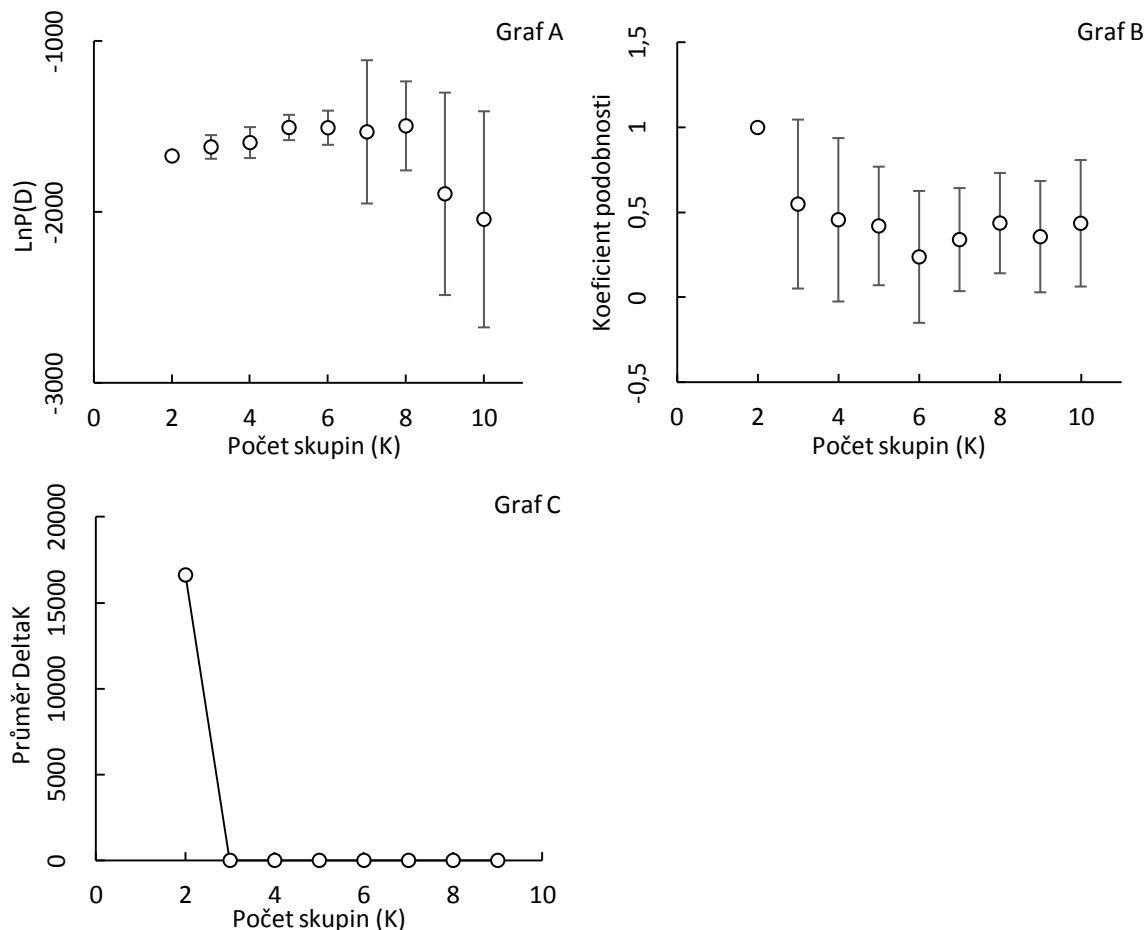
4.3.2 GENETICKÁ STRUKTURA DRUHŮ STEJNÉ PLOIDNÍ ÚROVNĚ

Pro jemnější určení genetické struktury a pro případnou detekci hybridizace mezi druhy stejných ploidii jsem celý datový soubor rozdělila podle ploidních úrovní, které zároveň odpovídaly třem vymezeným genetickým klastrům při analýze celého datového souboru (obrázek 9). Pomocí programu STRUCTURE jsem tedy analyzovala 3 oddělené skupiny populací.

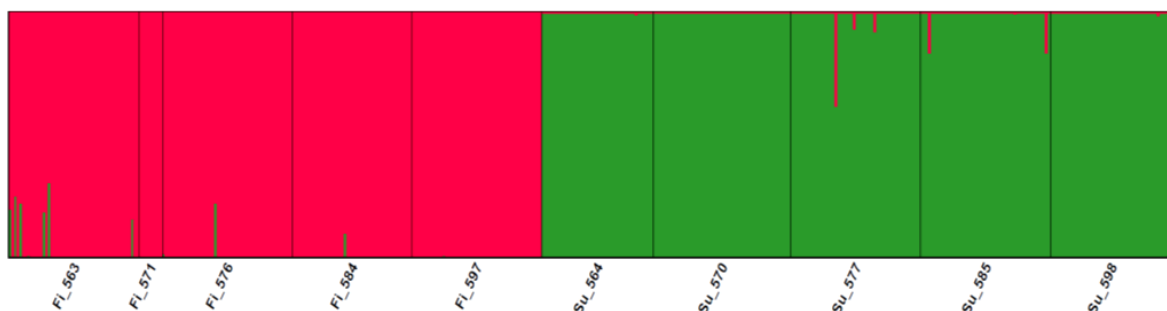
DIPLOIDNÍ DRUHY

Datový soubor čítající 448 jedinců zahrnoval všechny populace diploidních druhů *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum* rozdělených do 10 populací. Obrázek 10 (graf A, B, C) ukázal neoptimálnější rozdělení populací do 2 genetických klastrů (dále jen klastrů; $K = 2$). Z grafu A, který znázorňuje pravděpodobnost modelu ($\ln P(D)$) se vzrůstajícím počtem skupin (K) je patrné, že hned od bodu pro $K = 2$ dochází k narovnávání křivky. Graf B znázorňující podobnost mezi jednotlivými běhy ukázal nejvyšší koeficient podobnosti pro $K = 2$, který je 1. Populace tedy byly zařazeny do těchto 2 klastrů se 100% pravděpodobností. Průměr hodnot ΔK na grafu C ukázal také nejvyšší hodnotu pro $K = 2$.

Sloupcový diagram pro $K = 2$ (obrázek 11) rozdělil populace dle druhové příslušnosti. První klastr vytvořily populace *Ch. ficifolium* (červeně) a druhý klastr populace *Ch. suecicum* (zeleně). U obou druhů lze pozorovat, že někteří jedinci mají příměs klastru druhého druhu, což evidentně představuje výskyt hybridních jedinců. Celkem jsem v obou klastrech detekovala 13 hybridních jedinců. Na lokalitě Praha 7 se jednalo o jedince Fi_563_1, Fi_563_11, Fi_563_13, Fi_563_21, Fi_563_23 a Fi_563_7, na lokalitě Velký Rohozec Fi_576_28, Su_577_24, Su_577_30 a Su_577_38. Na lokalitě Hostivice byli detekováni 3 jedinci Fi_584_28, Su_585_12 a Su_585_8.



Obrázek 10 Analýza jednotlivých běhů pro diploidní druhy v programu STRUCTURE vyhodnocená pomocí STRUCTURE-sum-2009. Graf A znázornil pravděpodobnost modelu (LnP(D)), osa y) se vzrůstajícím počtem $K = 2-10$ (osa x). Ideální počet genetických klastrů je 2 ($K = 2$). Graf B vyjádřil koeficient podobnosti (osa y) mezi jednotlivými běhy pro dané $K = 2-10$ (osa x). Nejvyšší koeficient podobnosti má zde $K = 2$. Graf C vyjádřil optimální počet genetických klastrů (osa x) pomocí deltaK (osa y) pro dané $K = 2-10$. Optimální rozdělení jedinců je do 2 genetických klastrů.

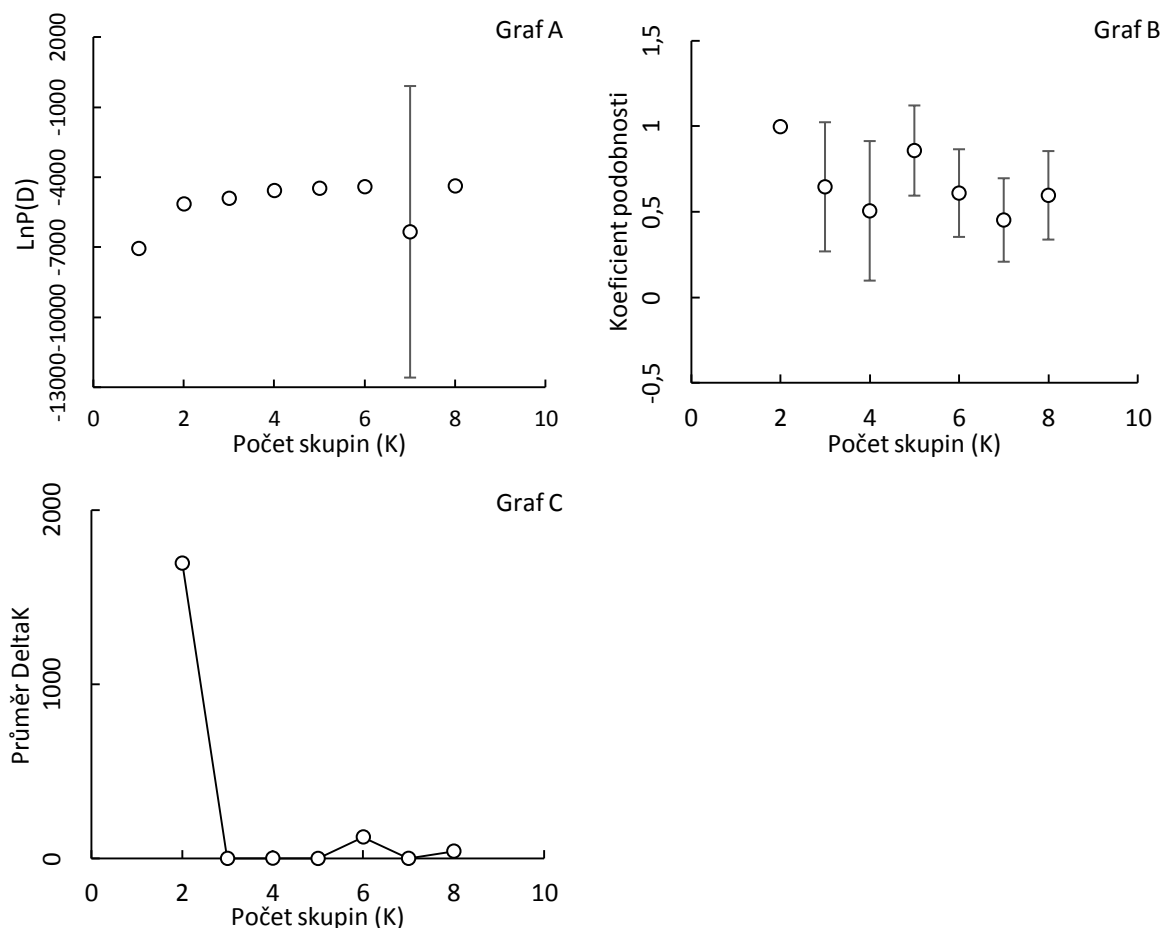


Obrázek 11 Sloupcový diagram pro $K = 2$ vizualizovaný pomocí programu DISTRUCT znázorňující 448 diploidních jedinců (10 populací – číslo pod diagramem) rozdělených do 2 genetických klastrů. Populace byly rozděleny do genetických klastrů dle druhové příslušnosti. První genetický klast (červeně) zahrnuje populace *Ch. ficifolium* (Fi) ve kterých můžeme pozorovat 8 hybridních jedinců (příměs zeleného genetického klastru). Druhý genetický klast (zeleně) zahrnuje populace *Ch. suecicum* (Su) kde lze detekovat 5 hybridních jedinců (příměs červeného genetického klastru).

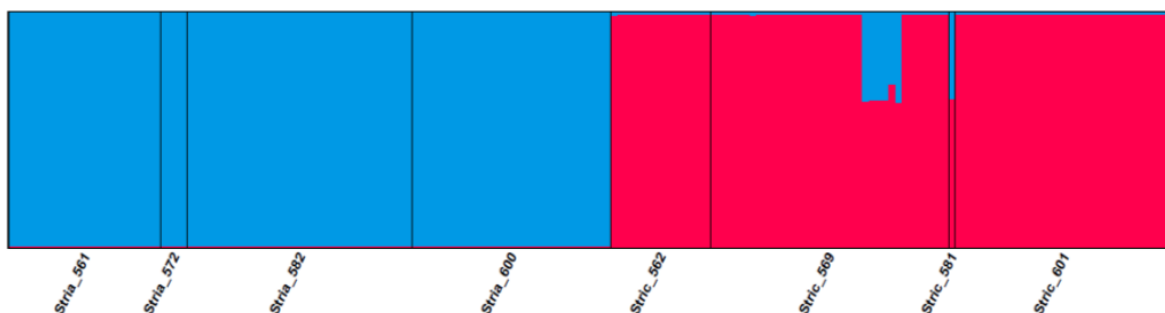
TETRAPLOIDNÍ DRUHY

Datový soubor zahrnoval 176 jedinců tetraploidních druhů *Ch. striatiforme* a *Ch. strictum* rozdělených do 8 populací. Obrázek 12 (graf A, B, C) ukázal neoptimálnější rozdělení jedinců do 2 genetických klastrů (dále jen klastrů; $K = 2$). Z grafu A, který znázorňuje pravděpodobnost modelu ($\text{LnP}(D)$) se vzrůstajícím počtem klastrů (K) je patrné, že od bodu pro $K = 2$ dochází k narovnávání křivky. Graf B znázorňující podobnost mezi jednotlivými běhy ukázal nejvyšší koeficient podobnosti pro $K = 2$, který je 1. Populace tedy byly zařazeny do 2 klastrů se 100% pravděpodobností. Průměr hodnot ΔK na grafu C jasně podpořil rozdělení populací do 2 klastrů.

Sloupcový diagram pro $K = 2$ (obrázek 13) znázorňuje přiřazení populací do klastrů dle druhové příslušnosti. První klastř vytvořily populace *Ch. striatiforme* (modře) a druhý klastř populace *Ch. strictum* (červeně). V klastřu s *Ch. strictum* jsem detekovala na 2 lokalitách celkem 7 hybridních jedinců. Jednalo se o jedince Stric_569_31, Stric_569_32, Stric_569_33, Stric_569_34, Stric_569_35 a Stric_569_36 na lokalitě Podbořany a Stric_581_1 na lokalitě Hostivice. V tomto případě se jedná o vůbec první detekované křížence mezi těmito tetraploidními druhy.



Obrázek 12 Analýza jednotlivých běhů pro tetraploidní druhy v programu STRUCTURE vyhodnocená pomocí STRUCTURE-sum-2009. Graf A znázornil pravděpodobnost modelu (LnP(D)), osa y) se vzrůstajícím počtem $K = 1-8$ (osa x). Ideální počet genetických klastřů je 2 ($K = 2$). Graf B vyjádřil koeficient podobnosti (osa y) mezi jednotlivými běhy pro dané $K = 2-8$ (osa x). Koeficient podobnosti ukázal nejvyšší podobnost pro $K = 2$. Graf C vyjádřil optimální počet genetických klastřů (osa x) pomocí deltaK (osa y) pro dané $K = 2-8$.

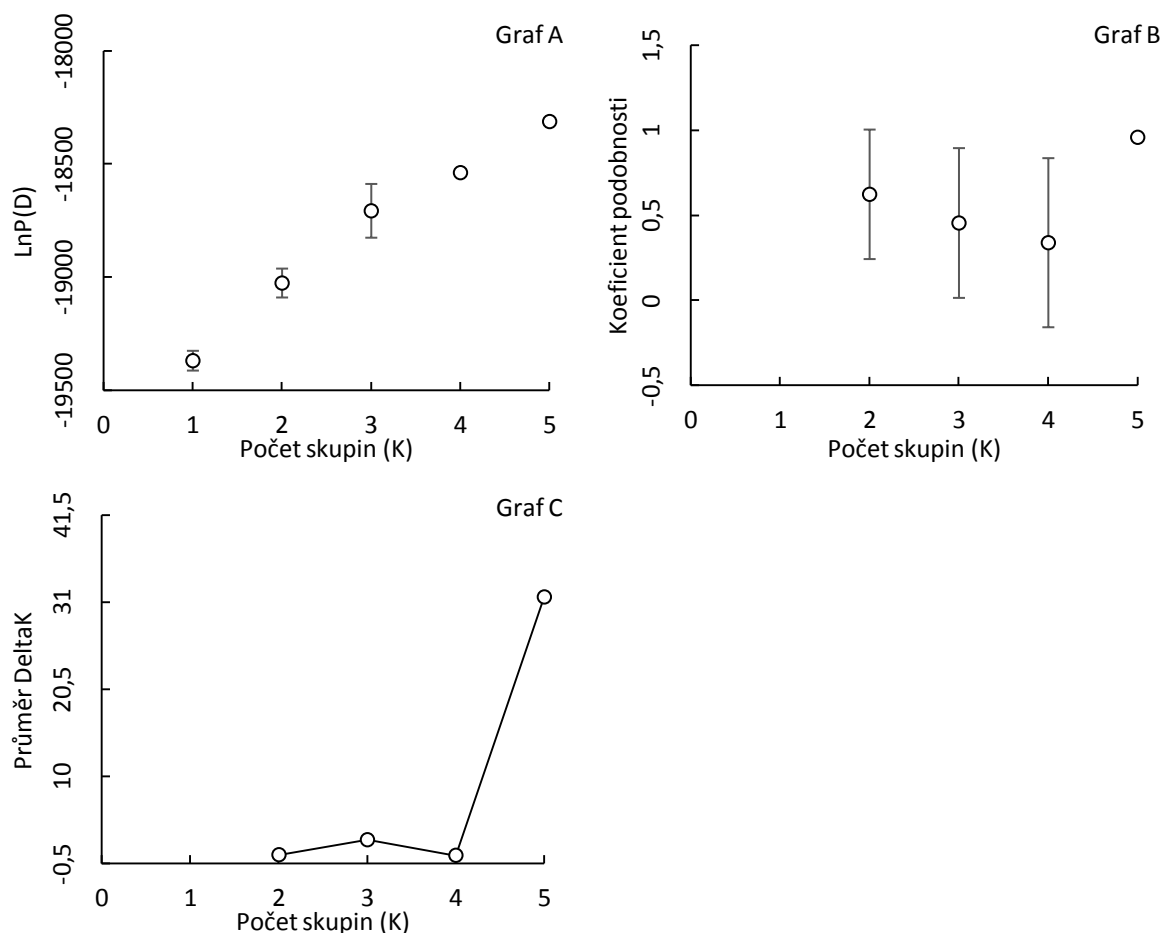


Obrázek 13 Sloupcový diagram pro $K = 2$ vizualizovaný pomocí programu DISTRUCT znázorňující 176 tetraploidních jedinců (8 populací – číslo pod diagramem) rozdělených do 2 genetických klastřů. Populace byly rozděleny do genetických klastřů dle druhové příslušnosti. První genetický klastř (modře) zahrnul populace *Ch. striatiforme* (Stria). Druhý genetický klastř (červeně) zahrnul populace *Ch. strictum* (Stric) kde lze v populaci 569 vidět 6 hybridních jedinců (příměs modrého genetického klastřu) a 1 hybridního jedince tvořícího populaci 581.

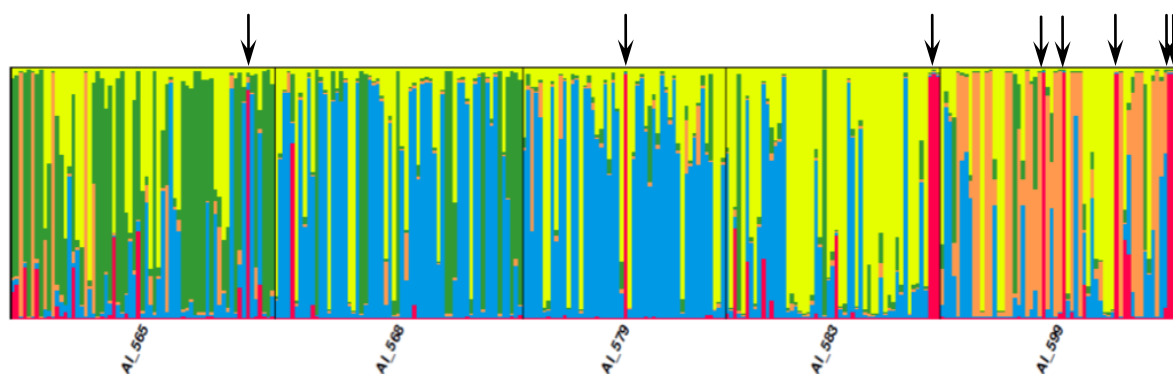
HEXAPLOIDNÍ DRUH *CHENOPODIUM ALBUM* S. STR.

Analyzovaný datový soubor zahrnoval 287 jedinců hexaploidního druhu *Ch. album* rozdělených do 5 populací podle lokalit. Analýzou výstupů z programu STRUCTURE vyšlo neoptimálnější rozřazení populací do 5 genetických klastřů (dále jen klastřů; obrázek 14, graf A, B, C). Graf A na obrázku 14, který znázorňuje pravděpodobnost modelu (LnP(D)) se vzrůstajícím počtem klastřů (K), ukázal nejvyšší hodnotu pro $K = 5$. Graf B znázorňující podobnost mezi jednotlivými běhy ukázal nejvyšší koeficient podobnosti pro $K = 5$, který je 0,96. Populace tedy byly zařazeny do 5 klastřů s 96% pravděpodobností. Průměr hodnot ΔK na grafu C také jasně podpořil rozdělení populací do 5 klastřů.

Sloupcový diagram pro $K = 5$ (obrázek 15) znázorňuje přiřazení populací do 5 klastřů. Na první pohled v diagramu nelze v datech žádnou hierarchickou strukturu. Nicméně, vysoká hodnota koeficientu podobnosti (obrázek 14, graf B) ukázal na velmi silnou strukturu v datech. Jednotlivé linie přítomné na lokalitách byly v tomto případě velmi spolehlivě detekovány Bayesiánskou analýzou. Dále, při srovnání s výsledky analýzy na obrázku 9, jsem u hexaploidních jedinců pozorovala poměrně silný trend. Všichni hexaploidní hybridní jedinci detekovaní na obrázku 9, kteří sdíleli klastř jak z diploidní, tak i z tetraploidní skupiny, náleželi při analýze jen hexaploidních populací na obrázku 15 alespoň ze $\frac{3}{4}$ samostatnému (v tomto případě červenému) klastřu. Výjimku tvoří jedinci Al_583_51 a Al_583_53, kteří měli na obrázku 15 také celý červený klastř, ale v analýze všech populací (obrázek 9) sdíleli pouze tetraploidní (modrý) klastř. Navíc, pokud detekovaní hybridní jedinci z celkové analýzy na obrázku 9 sdíleli pouze 1 klastř z tetraploidní skupiny, pak tyto jedinci na obrázku 15 obsahovali částečně červený klastř spolu s příměsí klastřu jiného. Výjimku tvoří Al_568_20 a Al_568_9, kteří byli detekováni na obrázku 9 jako kříženci s tetraploidním (modrým) klastřem, ale na obrázku 15 jen hexaploidních populací červený klastř nesdíleli. Jinými slovy, Bayesiánská analýza byla schopna detekovat nejen recentně vzniklé křížence, ale pravděpodobně i další generace těchto kříženců, jež se dále kříží s ostatními stabilizovanými a pravděpodobně dávnými kříženci. Pro lepší orientaci jsem do přílohy č. 4 umístila ještě jednou obrázek 15 hexaploidní skupiny populací, spolu s výřezem hexaploidní skupiny populací z obrázku 9 pro všechny populace, kde byli všichni recentně vzniklí kříženci označeni šipkou.



Obrázek 14 Analýza jednotlivých běhů pro hexaploidní populace *Ch. album* v programu STRUCTURE vyhodnocená pomocí STRUCTURE-sum-2009. Graf A znázornil pravděpodobnost modelu ($\ln P(D)$), osa y se vzrůstajícím počtem $K = 1-5$ (osa x). Nejvyšší hodnotu má $K = 5$. Graf B vyjádřil koeficient podobnosti (osa y) mezi jednotlivými běhy pro dané $K = 2-5$ (osa x). Koeficient podobnosti ukázal nejvyšší podobnost pro $K = 5$. Graf C vyjádřil optimální počet genetických klastrů (osa x) pomocí deltaK (osa y) pro dané $K = 2-5$, který také podpořil rozdělení populací do 5 genetických klastrů.

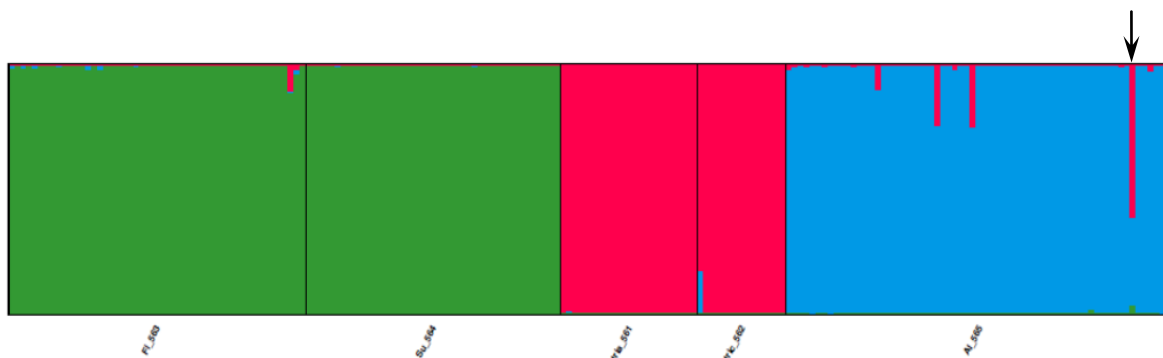


Obrázek 15 Sloupcový diagram pro $K = 5$ vizualizovaný pomocí programu DISTRUCT znázorňující 287 hexaploidních jedinců (5 populací – číslo pod diagramem) rozdělených do 5 genetických klastrů. V diagramu nelze vypořádat téměř žádnou hierarchii ve struktuře dat, ale můžeme zde najít určitý trend v zobrazení některých jedinců. Jedinci, kteří obsahují červený klast, byli v analýze zahrnutí všechny populace (obrázek 9) detekováni jako hybridní jedinci hexaploidního *Ch. album*. Šipkami jsou označeni recentně vzniklí jedinci *Ch. album* detekováni na obrázku 9.

4.3.3 GENETICKÁ STRUKTURA POPULACÍ NA 5 LOKALITÁCH

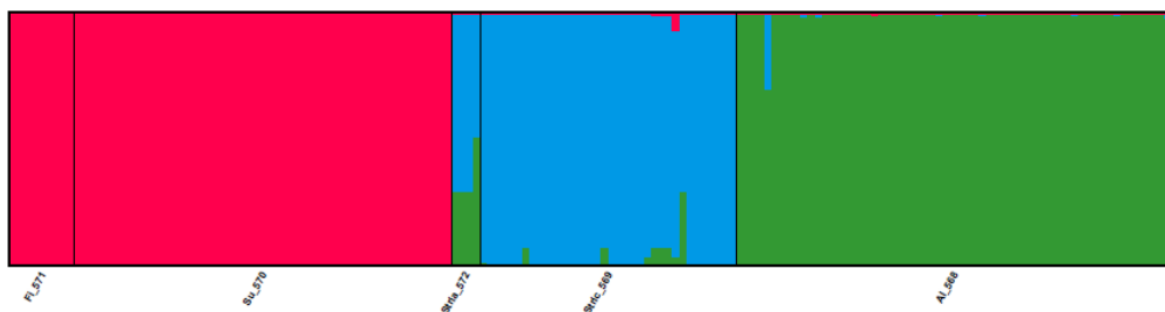
Pro určení jemnější struktury populací a potvrzení či vyvrácení recentně vzniklých hexaploidních jedinců *Ch. album* jsem datový soubor rozdělila po jednotlivých lokalitách. Výstupní hodnoty analýzy výsledků z programu STRUCTURE, tedy hodnoty, podle kterých jsem vybrala optimální počet genetických klastřů (= dále jen klastřů) pro zobrazení genetické struktury, jsou ve formě grafů pro jednotlivé lokality umístěny v příloze č. 5, 6, 7, 8, 9. I přesto, že analýza výstupu z programu STRUCTURE neukázala v některých hodnotách úplně 100% podporu, grafický výstup z programu DISTRUCT ukázal stabilní výsledky při detekci hybridních jedinců z jednotlivých lokalit ve srovnání s obrázkem 9 pro všechny lokality.

Obrázek 16 znázorňuje 5 populací a 196 jedinců z lokality Praha 7. Rozdělení populací do 3 klastřů sledoval ploidní úroveň (příloha č. 5). V klastru hexaploidní populace *Ch. album* (modře) jsem detekovala některé pravděpodobné křížence dávných a recentních kříženců *Ch. album* (příměs tetraploidního červeného klastru) i recentně vzniklého křížence *Ch. album* Al_565_62 detekovaného na obrázku 9, který obsahoval klastr z diploidní (zeleně) a tetraploidní (červeně) skupiny populací (označen šipkou).



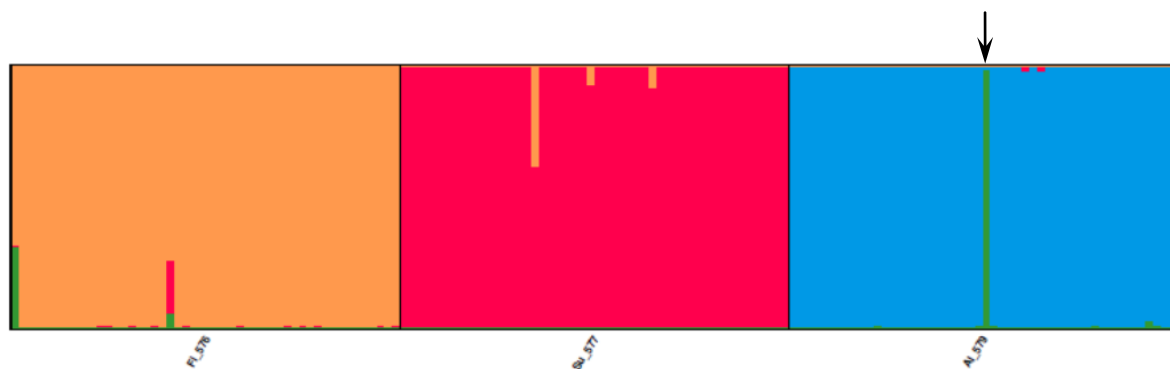
Obrázek 16 Sloupcový diagram pro $K = 3$ vizualizovaný pomocí programu DISTRUCT znázorňující 5 populací na lokalitě Praha 7 (populace – číslo pod diagramem). Populace zde byly rozděleny do genetických klastřů dle ploidní úrovně. První genetický klastr (zeleně) zahrnul populace *Ch. ficifolium* (Fi) a *Ch. suecicum* (Su). Druhý genetický klastr (červeně) zahrnul populace *Ch. striatiforme* (Stria) a *Ch. strictum* (Stric). Třetí genetický klastr (modře) zahrnul populaci *Ch. album*, kde je označen šipkou jeden recentní kříženec detekovaný na obrázku 9 pro všechny populace.

Obrázek 17 znázorňuje 5 populací a 163 jedinců z lokality Podbořany. Počet rozdělení populací do 3 klastrů opět sledoval ploidní úroveň (příloha č. 6). U hexaploidní populace (zeleně) jsem nedetkovala žádného recentně vzniklého hexaploidního křížence *Ch. album*, přičemž to se shoduje s výsledkem na obrázku 9 z analýzy pro všechny populace, kde jsem také neodhalila žádného recentně vzniklého křížence *Ch. album*.



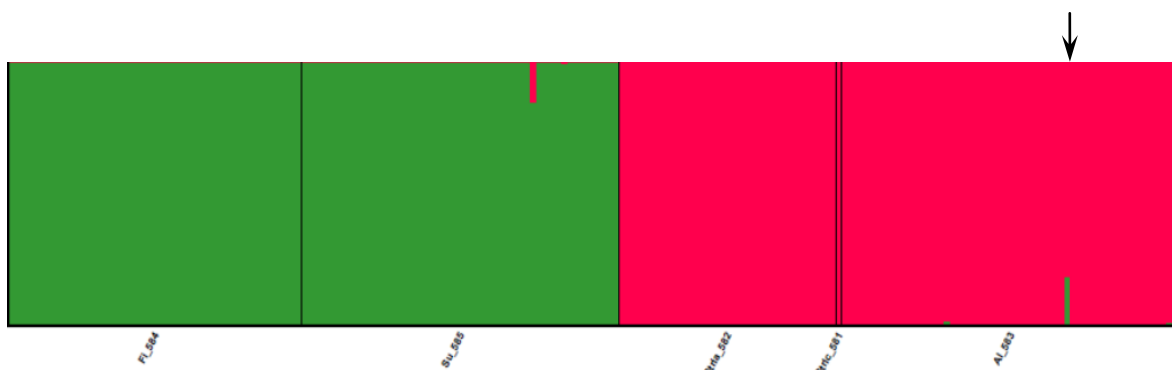
Obrázek 17 Sloupcový diagram pro $K = 3$ vizualizovaný pomocí programu DISTRUCT znázorňující 5 populací na lokalitě Podbořany (populace – číslo pod diagramem). Populace zde byly rozděleny do genetických klastrů dle ploidní úrovně. První genetický klast (červeně) zahrnul populace *Ch. ficifolium* (Fi) a *Ch. suecicum* (Su). Druhý genetický klast (modře) zahrnul populace *Ch. striatiforme* (Stria) a *Ch. strictum* (Stric). Třetí genetický klast (zeleně) zahrnul populaci *Ch. album*.

Obrázek 18 znázorňuje pouze 3 populace a 150 jedinců na lokalitě Velký Rohozec. V tomto případě analýza výstupů z programu STRUCTURE ukázala na nejoptimálnější rozdělení jedinců do 4 klastrů (příloha č. 7). To může být dáno detekcí pravděpodobného recentního křížence *Ch. album* Al_579_32 (zelený klast) v hexaploidní populaci (modře), i přes to, že jsem na této lokalitě tetraploidní druhy nenašla.



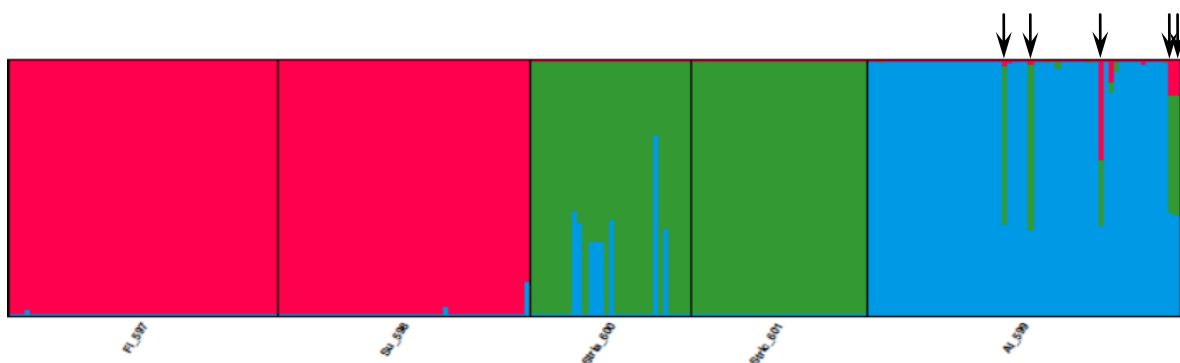
Obrázek 18 Sloupcový diagram pro $K = 4$ vizualizovaný pomocí programu DISTRUCT znázorňující 3 populace na lokalitě Velký Rohozec (populace – číslo pod diagramem). První genetický klast (oranžově) zahrnul populaci *Ch. ficifolium* (Fi). Druhý genetický klast (červeně) zahrnul populaci *Ch. suecicum* (Su). Třetí genetický klast (modře) zahrnul populaci *Ch. album* s příměsí zeleného klastru u 1 jedince (označen šipkou), kterého jsem na obrázku 9 pro všechny populace detekovala jako recentního křížence.

Obrázek 19 znázorňuje sloupcový diagram 5 populací a 184 jedinců na lokalitě Hostivice. Analýza výstupu ze STRUCTURE ukázala neoptimálnější rozdělení populací pouze do 2 klastrů (příloha č. 8), tudíž jsem nemohla potvrdit recentního křížence *Ch. album* Al_583_52 detekovaného na obrázku 9, ale zaznamenala jsem u tohoto jedince klastr z diploidní (zeleně) skupiny. Vysoká podpora přiřazení tetraploidní a hexaploidní populace do 1 klastru (červeně) si lze vysvětlit velkou genetickou blízkostí obou druhů.



Obrázek 19 Sloupcový diagram pro $K = 2$ vizualizovaný pomocí programu DISTRUCT znázorňující 5 populací na lokalitě Hostivice (populace – číslo pod diagramem). První genetický klastr (zeleně) zahrnul diploidní populace *Ch. ficifolium* (Fi) a *Ch. suecicum* (Su). Druhý genetický klastr (červeně) zahrnul tetraploidní populace *Ch. striatiforme* (Stria) a *Ch. strictum* (Stric) a hexaploidní populaci *Ch. album* s příměsí zeleného klastru u 1 jedince (označen šipkou), kterého jsem na obrázku 9 pro všechny populace detekovala jako recentního křížence.

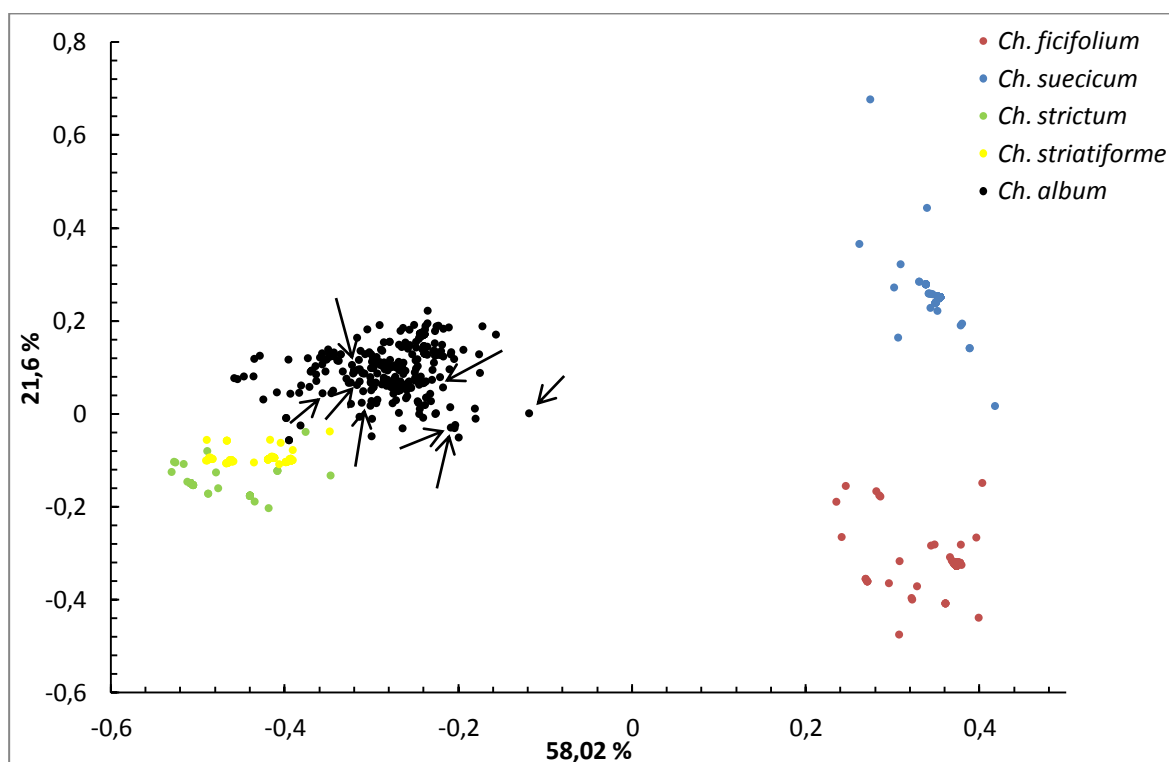
Obrázek 20 znázorňuje 5 populací a 218 jedinců na lokalitě Vrané nad Vltavou. Rozdělení populací do 3 klastrů sledoval ploidní úrovně. U hexaploidní populace (modře) jsem opět detekovala recentní hexaploidní křížence *Ch. album* z obrázku 9. Jednalo se o jedince Al_599_32, Al_599_37, Al_599_41, Al_599_49, Al_599_58 a Al_599_59.



Obrázek 20 Sloupcový diagram pro $K = 3$ vizualizovaný pomocí programu DISTRUCT znázorňující 5 populací na lokalitě Vrané nad Vltavou (populace – číslo pod diagramem). Populace zde byly rozděleny do genetických klastrů dle ploidní úrovně. První genetický klastr (červeně) zahrnul populace *Ch. ficifolium* (Fi) a *Ch. suecicum* (Su). Druhý genetický klastr (zeleně) zahrnul populace *Ch. striatiforme* (Stria) a *Ch. strictum* (Stric). Třetí genetický klastr (modře) zahrnul populaci *Ch. album*. Šipkou jsou označeni jedinci s příměsí klastru diploidní (červeně) a tetraploidní (zeleně) skupiny populací, které jsem detekovala jako recentní křížence na obrázku 9 pro všechny populace.

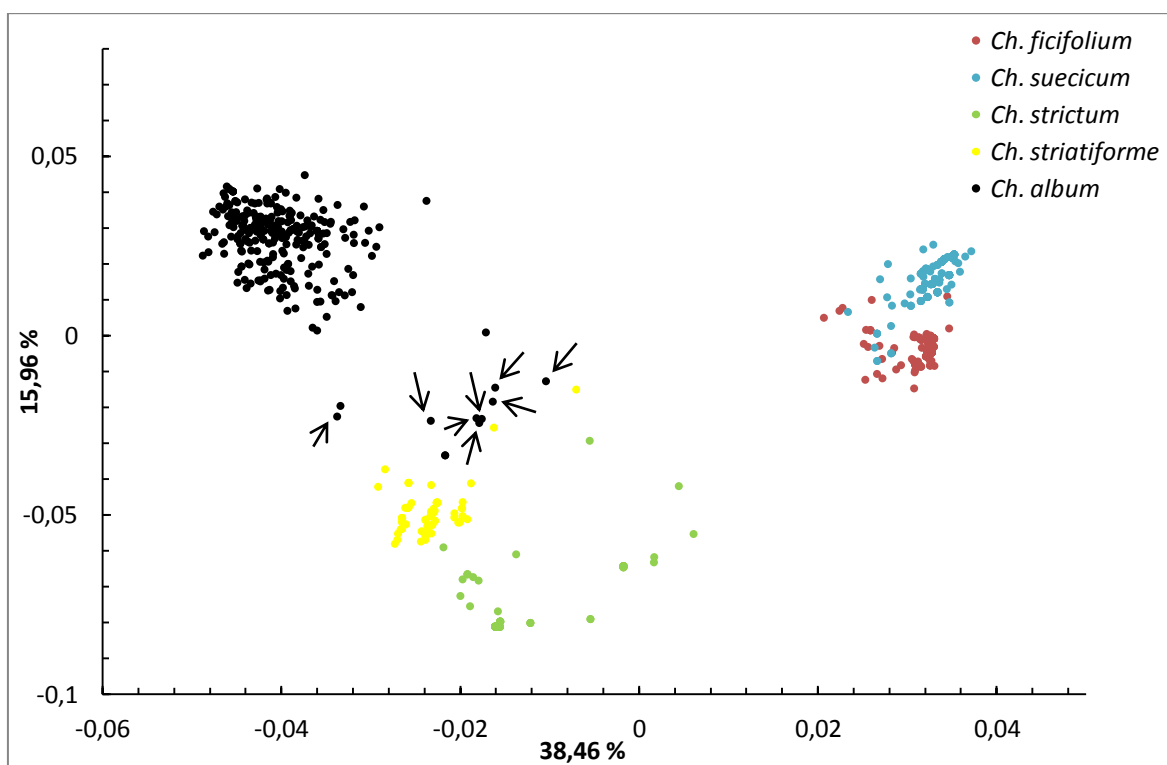
4.4 ANALÝZA HLAVNÍCH KOORDINÁT (PCoA)

Za účelem porovnání výsledků z analýzy Baeysánského klastrování v programu STRUCTURE, jsem data dále analyzovala jinou metodou. Pro zobrazení základní struktury dat všech druhů zastoupených 911 jedinci (tabulka 4) jsem zvolila analýzu hlavních koordinát. Analýza PCoA za použití *Lynch distance* dobře rozlišila všechny druhy, přičemž na obrázku 21 lze vidět, že diploidní druhy *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum* vytvořily 2 skupiny vzdálené od polyploidních druhů, které vytvořily větší shluk tří, ne zcela jasně diferencovaných skupin. Tetraploidní druhy *Ch. strictum* a *Ch. striatiforme* se částečně překrývají a někteří jedinci se spíše připojili ke shluku hexaploidních jedinců druhu *Ch. album*. To bylo pravděpodobně způsobeno přítomností mnoha společných alel. Na obrázku 21 byli označeni šipkou jedinci, které jsem v analýze pomocí STRUCTURE (obrázek 9) vyhodnotila jako recentní křížence *Ch. album*.



Obrázek 21 Analýza hlavních koordinát (PCoA) mikrosatelitových dat všech studovaných zástupců *Chenopodium album* agg. (911 jedinců). Sekundární matice dat byla vygenerována pomocí R skriptu POLYSAT za použití *Lynch distance*. Šípkami jsou označeni jedinci detekovaní jako recentní kříženci *Ch. album* na obrázku 9. Procenta vysvětlené variability jsou u jednotlivých os.

Z důvodu srovnání podobnosti mezi výsledky PCoA při použití odlišného způsobu výpočtu genetických vzdáleností, jsem ta samá data analyzovala za použití Jaccardova indexu podobnosti (*Jaccard index similarity*). Na obrázku 22 je vidět jemnější a odlišné rozložení jedinců než v případě užití *Lynch distance* (obrázek 21). Opět se rozlišilo 5 skupin odpovídající studovaným druhům. Můžeme zde ale pozorovat jemnější rozdělení jedinců dle ploidii a detekovat lépe potenciální hybridní jedince stojící mezi jednotlivými druhy. Diploidní druhy (*Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum*) vytvořily spíše jednu skupinu a částečně se překrývají. Tetraploidní druhy (*Ch. striatiforme* a *Ch. strictum*) vytvořily skupinu mezi diploidními a hexaploidními druhy. Hexaploidní druh *Ch. album* vytvořil jasně oddělenou skupinu od ostatních druhů, avšak někteří jedinci se umístili mimo tuto skupinu a většinu z nich jsem pomocí Baeysovské analýzy v programu STRUCTURE (obrázek 9) detekovala jako recentně vzniklé křížence. Tyto jedince jsem na obrázku 22 označila šipkou.



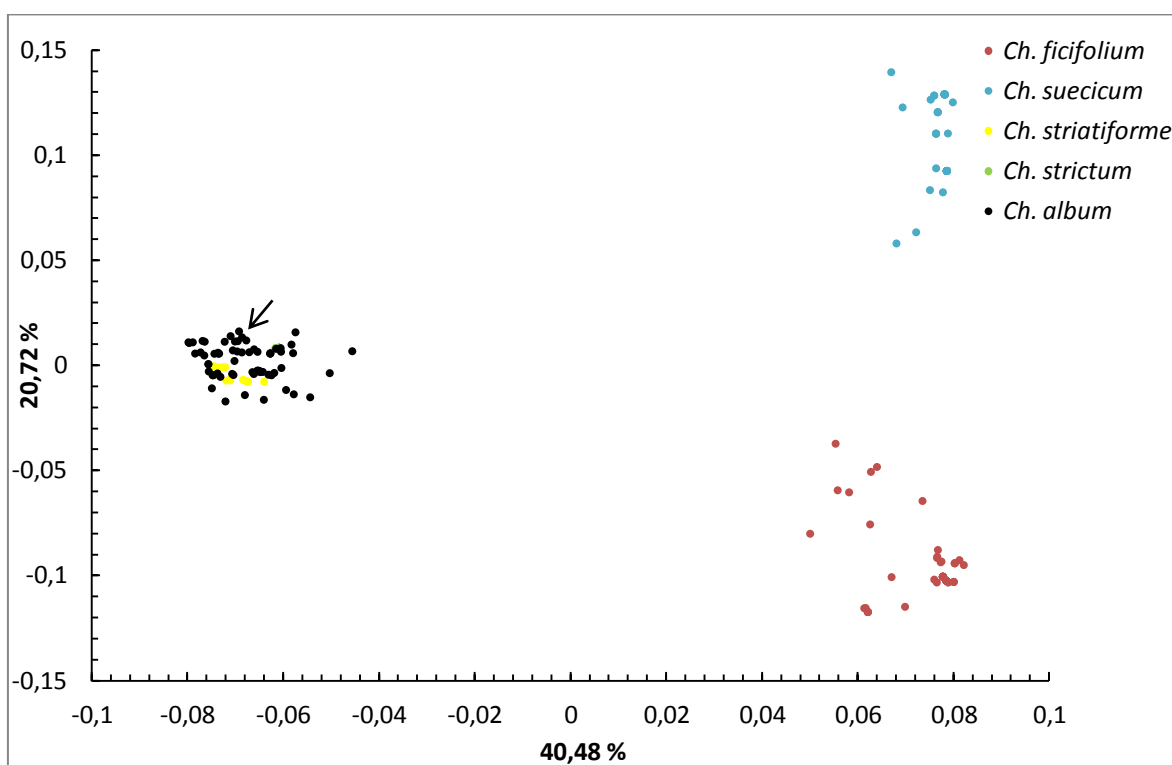
Obrázek 22 Analýza hlavních koordinát (PCoA) mikrosatelitových dat všech studovaných zástupců *Chenopodium album* agg. (911 jedinců). Sekundární matice dat byla vygenerována pomocí programu PAST za použití Jaccardova indexu podobnosti (*Jaccard index similarity*). Na obrázku je vidět určitý trend rozdělení druhů dle ploidii, kde *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum* vytvořily diploidní skupinu, *Ch. striatiforme* a *Ch. strictum* vytvořily tetraploidní skupinu a *Ch. album* hexaploidní skupinu jedinců. Šipkami jsou označeni jedinci, kteří byli detekováni jako recentní kříženci *Ch. album* v analýze pomocí STRUCTURE na obrázku 9. Procenta vysvětlené variability jsou u jednotlivých os.

4.4.1 ANALÝZA HLAVNÍCH KOORDINÁT PRO JEDNOTLIVÉ LOKALITY

Dále jsem analyzovala data po jednotlivých lokalitách pomocí PCoA. Po předchozích analýzách hlavních koordinát pro všechny jedince za použití dvou různých koeficientů (indexů) pro výpočet sekundární matice dat, jsem vyhodnotila, že lepší výsledky poskytuje Jaccardův index podobnosti, a proto jsou zde umístěny analýzy pouze s tímto indexem. Na všech grafických výstupech jsou šipkou vyznačeni jedinci, které jsem vyhodnotila pomocí STRUCTURE (obrázek 9) jako recentně vzniklé křížence *Ch. album*. Pro objektivní hodnocení dat jsem vytvořila grafy i na základě *Lynch distance*, která má velmi podobné *pattern* na všech lokalitách, a proto jsem je umístila do přílohy č. 10.

LOKALITA PRAHA 7

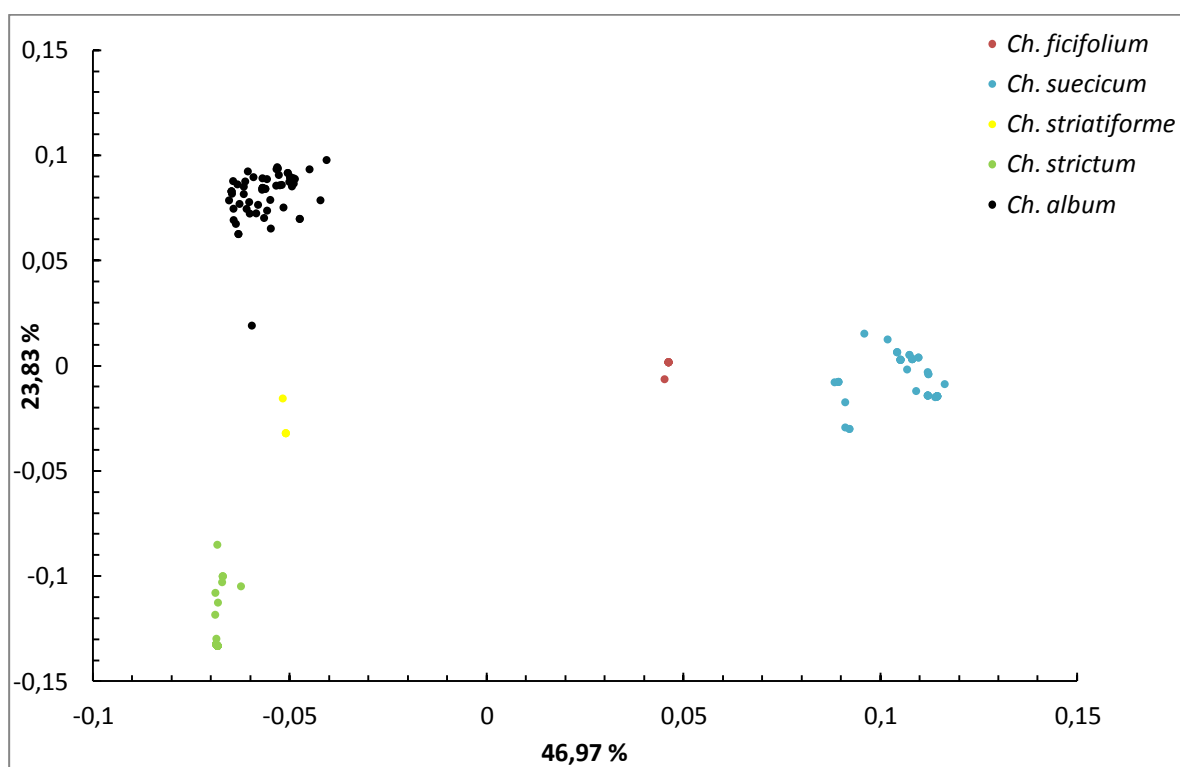
Obrázek 23 znázorňuje strukturu datového souboru 196 jedinců na lokalitě Praha 7. Analýzou s Jaccardovým indexem podobnosti se dobře rozdělily diploidní druhy *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum*. Tetraploidní druhy *Ch. striatiforme* a *Ch. strictum* jsou zde zcela promíchané s jedinci hexaploidního druhu *Ch. album*. Detekovaný recentní kříženec pomocí STRUCTURE (obrázek 9), kde převažoval z velké části klastr z tetraploidní skupiny populací, jsem zde detekovala na okraji hexaploidní skupiny jedinců (na obrázku 23 označen šipkou). Dále analýza ukázala značnou podobnost mezi tetraploidními a hexaploidními druhy.



Obrázek 23 Analýza hlavních koordinát (PCoA) 196 jedinců *Chenopodium album* agg. z lokality Praha 7 vytvořená na základě mikrosatelitových dat. Sekundární matice dat byla vygenerována pomocí programu PAST za použití Jaccardova indexu podobnosti. Na obrázku jsou vidět druhy *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum* tvořící diploidní skupinu, *Ch. striatiforme* a *Ch. strictum* tvořící tetraploidní skupinu a *Ch. album* hexaploidní skupinu jedinců. Šipkou je označen recentní kříženec *Ch. album* detekovaný pomocí STRUCTURE na obrázku 9. Procenta vysvětlené variability jsou u jednotlivých os.

LOKALITA PODBOŘANY

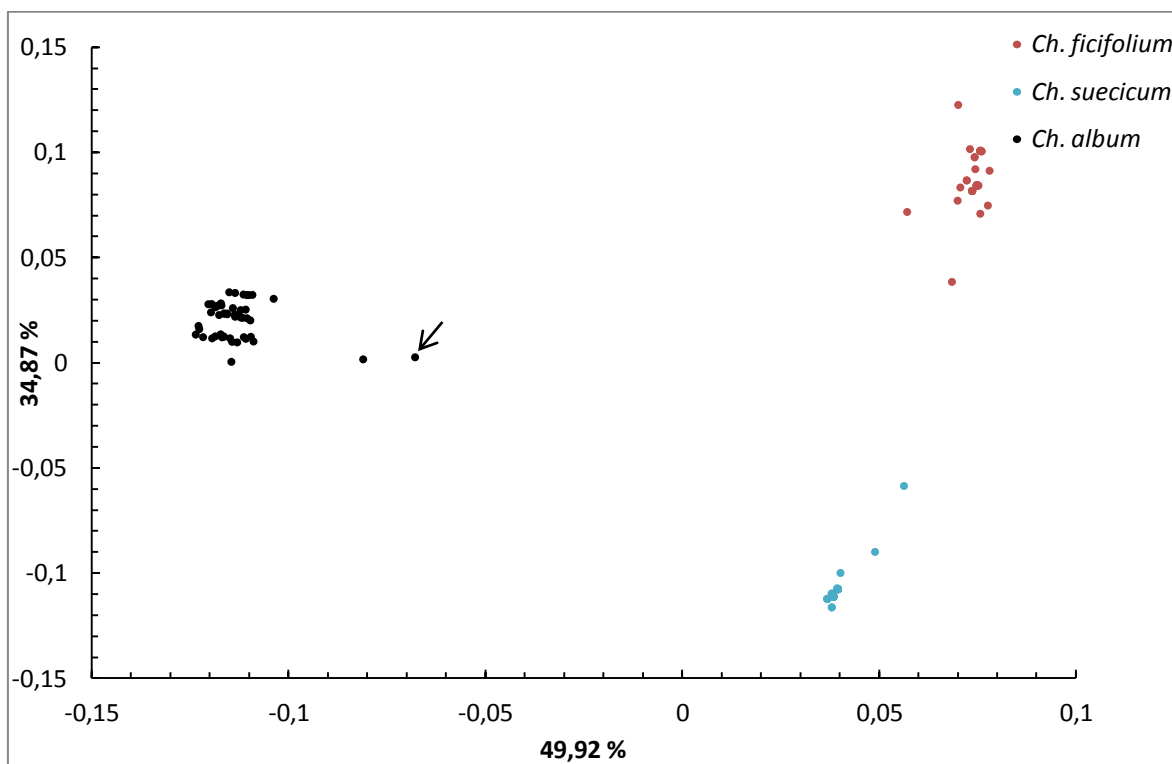
Obrázek 24 znázorňuje strukturu datového souboru 163 jedinců na lokalitě Podbořany. Analýzou se dobře rozdělily diploidní druhy *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum*. Jedinci *Ch. ficifolium* se zde umístili blíže k polyploidním druhům. Tetraploidní druhy *Ch. striatiforme*, *Ch. strictum* a hexaploidní druh *Ch. album* vytvořily samostatné, dobře rozdělené skupiny jedinců dle druhové příslušnosti. Výjimku tvoří 1 jedinec *Ch. album*, který se umístil mezi hexaploidní skupinu jedinců a tetraploidní skupinu jedinců druhu *Ch. striatiforme*. Na této lokalitě pomocí STRUCTURE nebyl detekován žádný recentní kříženec *Ch. album*.



Obrázek 24 Analýza hlavních koordinát (PCoA) 163 jedinců *Chenopodium album* agg. z lokality Podbořany vytvořená na základě mikrosatelitových dat. Sekundární matice dat byla vygenerována pomocí programu PAST za použití Jaccardova indexu podobnosti. Na obrázku jsou vidět dobře oddělené druhy *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum* tvořící diploidní skupinu, *Ch. striatiforme* a *Ch. strictum* tvoří tetraploidní skupinu a *Ch. album* hexaploidní skupinu jedinců. Procenta vysvětlené variability jsou u jednotlivých os.

LOKALITA VELKÝ ROHOZEC

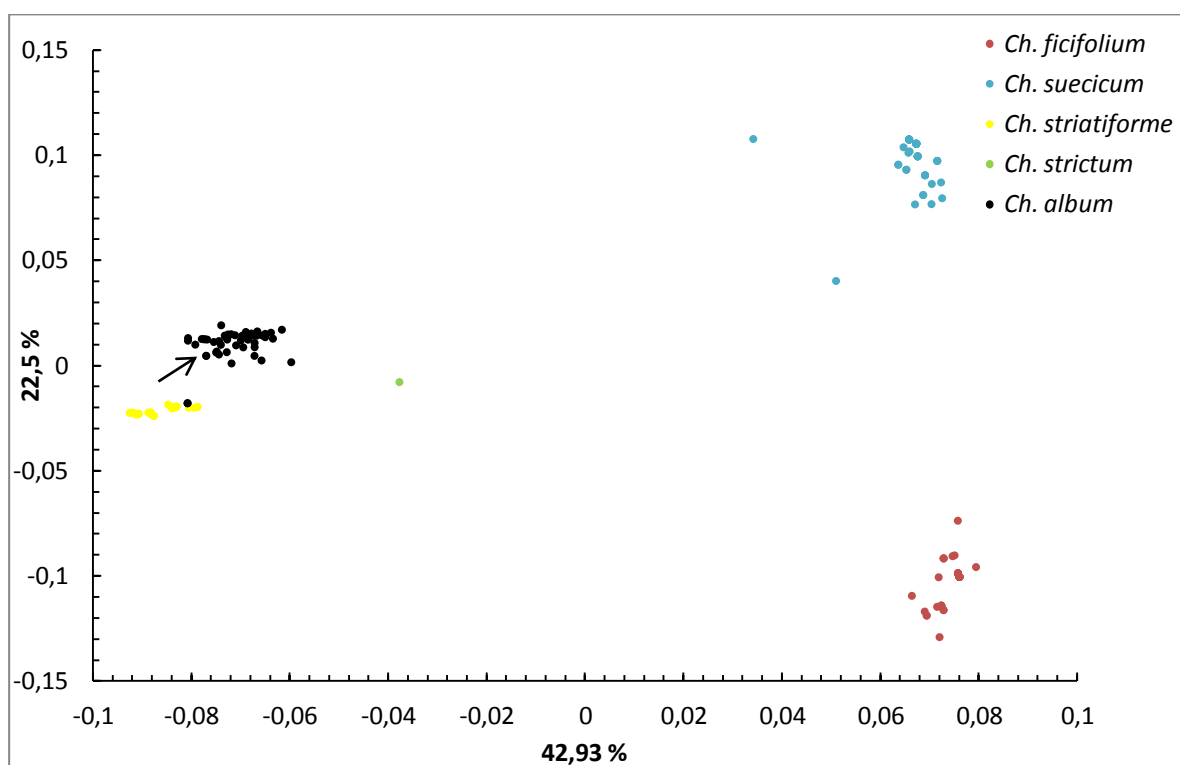
Obrázek 25 znázorňuje strukturu datového souboru 200 jedinců na lokalitě Velký Rohozec, kde byly nalezeny pouze 3 druhy *Ch. ficifolium*, *Ch. suecicum* a *Ch. album*. Na obrázku lze pozorovat velkou vzdálenost mezi diploidními druhy *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum* a také od hexaploidního druhu *Ch. album*. Zde můžeme pozorovat 2 jedince *Ch. album*, kteří se umístili už mimo hexaploidní skupinu jedinců, přičemž jednoho z nich jsem detekovala pomocí STRUCTURE (obrázek 9) jako recentního křížence (na obrázku 25 označen šipkou) a to i přes absenci tetraploidních druhů na lokalitě.



Obrázek 25 Analýza hlavních koordinát (PCoA) 200 jedinců *Chenopodium album* agg. z lokality Velký Rohozec vytvořená na základě mikrosatelitových dat. Sekundární matice dat byla vygenerována pomocí programu PAST za použití Jaccardova indexu podobnosti. Na obrázku jsou vidět diploidní druhy *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum* a hexaploidní druh *Ch. album*. Šipkou je označen recentní kříženec *Ch. album* detekovaný pomocí STRUCTURE na obrázku 9. Procenta vysvětlené variability jsou u jednotlivých os.

LOKALITA HOSTIVICE

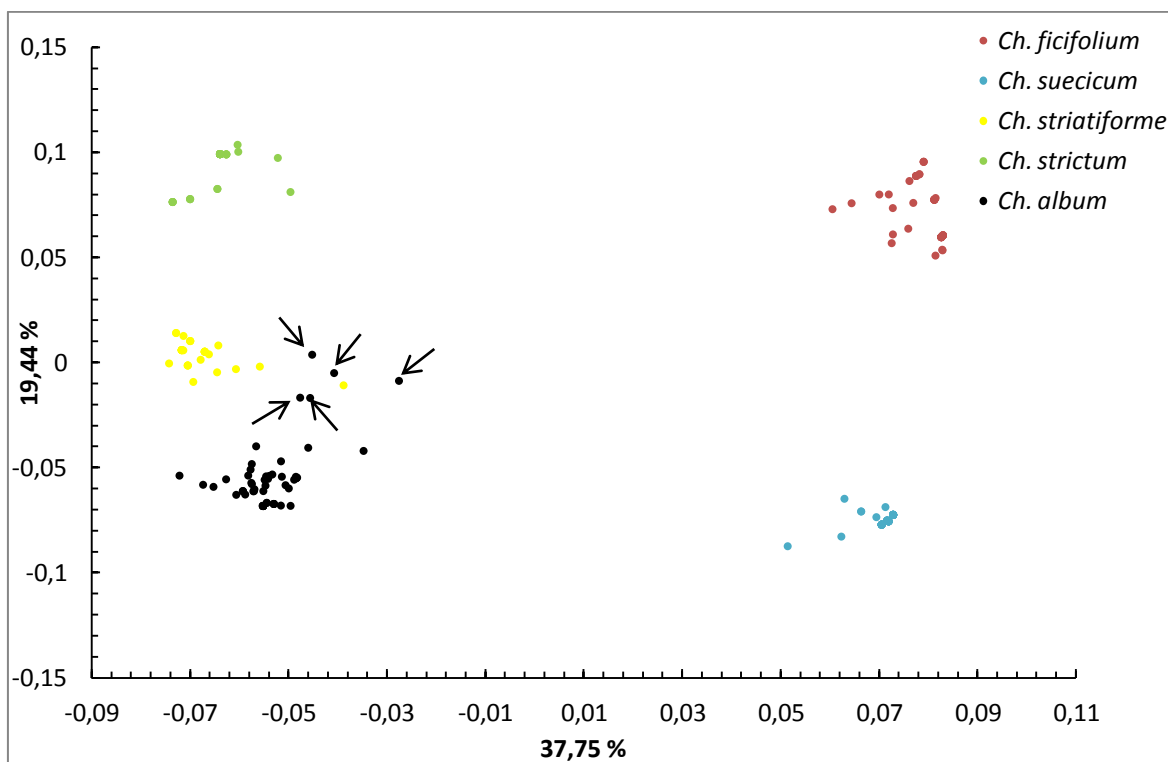
Obrázek 26 znázorňuje strukturu datového souboru 184 jedinců na lokalitě Hostivice. Analýzou se dobře rozdělily diploidní druhy *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum*, přičemž u *Ch. suecicum* byli 2 jedinci umístěni blíže k polyploidním druhům. Dále zde můžeme vidět, že jsou polyploidní druhy umístěny poměrně blízko u sebe. Do skupiny jedinců druhu *Ch. striatiforme* se zařadil 1 jedinec z hexaploidní skupiny jedinců *Ch. album*. Detekovaný recentní kříženec pomocí STRUCTURE (obrázek 9) byl na obrázku 26 umístěn na okraj skupiny jedinců druhu *Ch. album* (označen šipkou), který má blíže k tetraploidní skupině jedinců druhu *Ch. striatiforme*. Jeho pozice blízká spíše k této skupině a velká vzdálenost od diploidních druhů odpovídá i výstupu ze STRUCTURE (obrázek 9), kde klastr z tetraploidní skupiny populací převažoval nad klastrem z diploidní skupiny, který byl zastoupen ve velmi malé míře.



Obrázek 26 Analýza hlavních koordinát (PCoA) 184 jedinců *Chenopodium album* agg. z lokality Hostivice vytvořená na základě mikrosatelitových dat. Sekundární matice dat byla vygenerována pomocí programu PAST za použití Jaccardova indexu podobnosti. Na obrázku jsou vidět druhy *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum* tvořící diploidní skupinu, *Ch. striatiforme* a *Ch. strictum* tvoří tetraploidní skupinu a *Ch. album* hexaploidní skupinu jedinců. Šipkou je označen recentní kříženec *Ch. album* detekovaný pomocí STRUCTURE na obrázku 9. Procenta vysvětlené variability jsou u jednotlivých os.

LOKALITA VRANÉ NAD VLTAVOU

Obrázek 27 znázorňuje strukturu datového souboru 218 jedinců na lokalitě Vrané nad Vltavou. Analýzou se dobře rozdělily diploidní druhy *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum*. Dále zde můžeme vidět, že jedinci polyploidních druhů *Ch. striatiforme* a *Ch. album* se umístili poměrně blízko k sobě, přičemž jedinci tetraploidního *Ch. strictum* zaujali od předešlých druhů vzdálenější pozici a vytvořili samostatnou skupinu jedinců. Ke skupině druhu *Ch. striatiforme* se přiřadili někteří jedinci z hexaploidní skupiny *Ch. album*, kteří byli pomocí STRUCTURE (obrázek 9) detekováni jako recentní kříženci. U těchto recentních kříženců (označení šipkami) pozorujeme na obrázku 27 i bližší pozici vůči diploidním druhům, což se analýzou STRUCTURE (obrázek 9) projevilo poměrně zřetelným zastoupením klastru z diploidní skupiny populací.

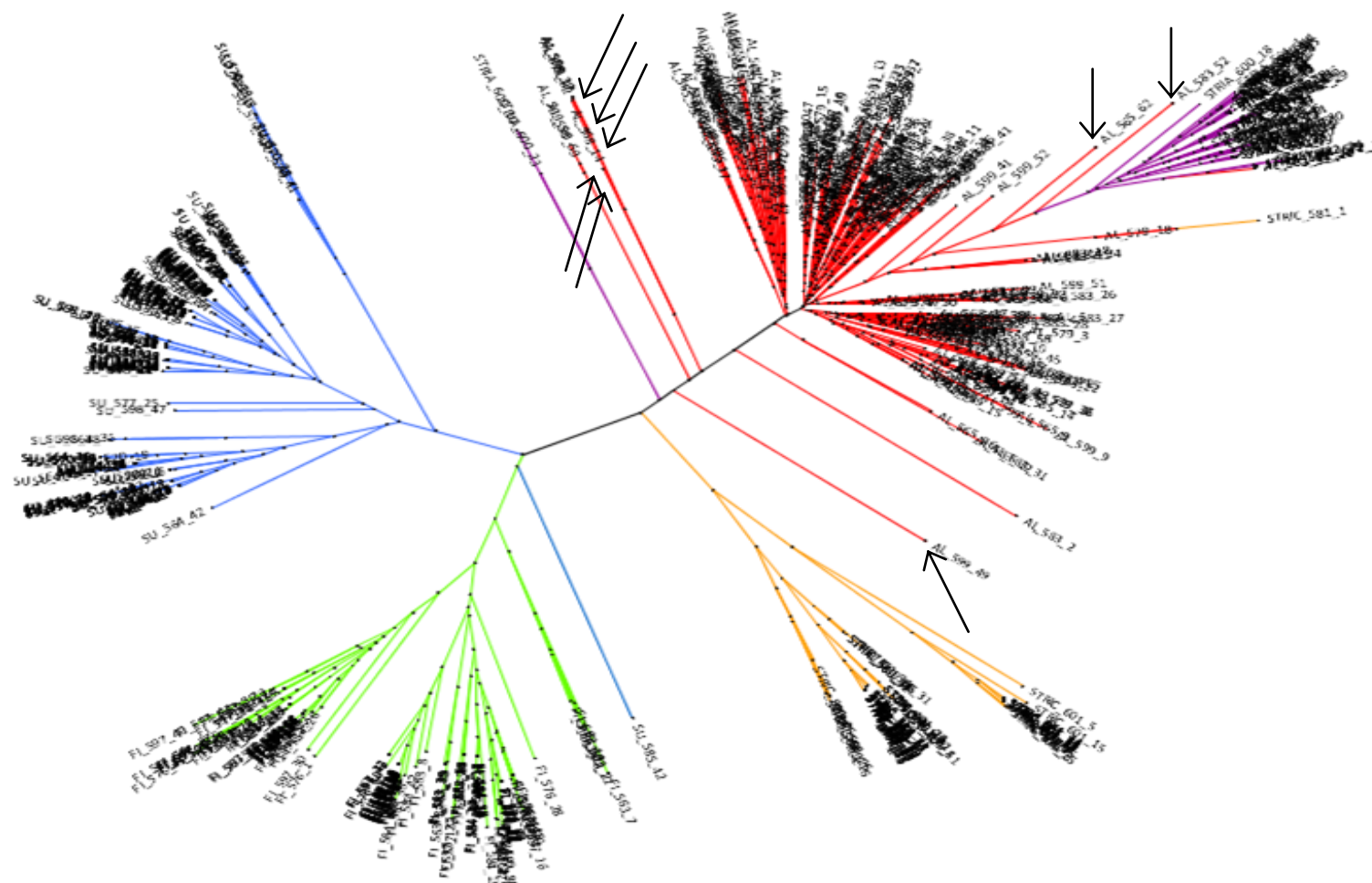


Obrázek 27 Analýza hlavních koordinát (PCoA) 218 jedinců *Chenopodium album* agg. z lokality Vrané nad Vltavou vytvořená na základě mikrosatelitových dat. Sekundární matice dat byla vygenerována pomocí programu PAST za použití Jaccardova indexu podobnosti. Na obrázku jsou vidět druhy *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum*, které tvoří diploidní skupinu, *Ch. striatiforme* a *Ch. strictum* tvoří tetraploidní skupinu a *Ch. album* hexaploidní skupinu jedinců. Šipkou jsou označeni recentní kříženci *Ch. album* detekováni pomocí STRUCTURE na obrázku 9. Procenta vysvětlené variability jsou u jednotlivých os.

4.5 FYLOGENETICKÝ STROM VYTVOŘENÝ METODOU *NEIGHBOUR-JOINING*

Za účelem vizualizace komplexních vztahů mezi studovanými druhy všech 911 jedinců jsem vytvořila nezakořeněný fylogenetický strom metodou *Neighbour-joining* na základě Jaccardovy matice podobnosti.

Na obrázku 28 můžeme vidět, že až na několik výjimek se jedinci rozdělili dle druhové příslušnosti. Nejlépe se rozlišily větve s diploidními druhy, které se zde zřetelně oddělily od polyploidních druhů. První větev zahrnuje zástupce diploidního druhu *Ch. ficifolium* (zeleně). Do této větve byl zařazen 1 jedinec druhu *Ch. suecicum* (Su_582_42), který vytvořil druhou, jasně rozlišenou větev (modře). Třetí rozlišená větev zahrnuje tetraploidní zástupce druhu *Ch. strictum* (oranžově), kam se kromě jednoho jedince Stric_581_1, který byl přiřazen k hexaploidnímu druhu *Ch. album* (červeně), zařadili všichni zástupci druhu *Ch. strictum*. Hexaploidní druh *Ch. album* se rozpadl na 3 větší větve, ale několik jedinců se umístilo přímo na bázi celého stromu. Poslední větev vytvořily 2 druhy a to na bázi s několika jedinci druhu *Ch. album* (s již zmíněným jedním jedincem *Ch. strictum*) a tetraploidním druhem *Ch. striatiforme* (fialově), jehož zástupci vytvořili konec této větve. Na konec této větve byl přiřazen i 1 jedinec druhu *Ch. album* (Al_583_53). Dva jedinci druhu *Ch. striatiforme* (Stria_600_23 a Stria_600_30) byli zařazeni přímo na bázi celého stromu. Detekované recentní křížence pomocí STRUCTURE (obrázek 9) jsem označila na obrázku 28 šipkami.



Obrázek 28 Nezakořeněný strom 911 jedinců skupiny *Ch. album* vytvořený metodou *Neighbour-joining* na základě Jaccardovy matice podobnosti. Tato matice byla vytvořena v programu FAMM na základě binární matice mikrosatelitových dat. Na obrázku lze vidět diploidní druhy *Ch. ficifolium* (zeleně) a *Ch. suecicum* (modře), tetraploidní druhy *Ch. strictum* (oranžově) a *Ch. striatiforme* (fialově) a hexaploidní druh *Ch. album* (červeně). Šipkami jsou označeni recentní kříženci *Ch. album* detekováni pomocí STRUCTURE (obrázek 9).

5 DISKUSE

5.1 CROSS-AMPLIFIKACE A GENETICKÁ VARIABILITA MIKROSATELITŮ

K zodpovězení otázek postulovaných v úvodu práce jsem si vybrala vysoce variabilní mikrosatelitové markery (Schlötterer 2000). Jelikož pro studovanou skupinu žádné mikrosatelitové markery doposud vyvinuté nebyly, pokusila jsem se o jejich cross-amplifikaci, tedy přenesení z blízkce příbuzného druhu. Bohužel tato metoda nemusí být vždy úspěšná, protože je potřeba najít vhodný, velmi blízkce příbuzný druh, pro který již mikrosatelity byly vyvinuty. Úspěšností přenosu mikrosatelitů a limitacemi této metody se zabývali Barbará et al. (2007), kteří uvádějí, že nejsnáze jsou přenositelné mikrosatelitové markery mezi blízkce příbuznými druhy stejného rodu. Avšak z jejich výsledků také vyplývá, že úspěšnost přenosu mikrosatelitů je nerovnoměrně rozložena napříč různými taxony.

K přenosu jsem použila jihoamerický druh *Ch. quinoa*, pro který bylo vyvinuto 613 mikrosatelitových primerů (Jarvis et al. 2008; Mason et al. 2005). Vybrán byl proto, že se jedná o alotetraploidní druh ($2n = 4x = 36$), který pravděpodobně obsahuje genom z diploidních druhů *Ch. ficifolium*/*Ch. suecicum* a *Ch. incanum* (S. Watson) A. Heller/*Ch. standleyanum* Aellen (Štorchová et al. 2014). Jelikož pravděpodobně obsahuje genom z *Ch. ficifolium*, předpokládala jsem vyšší pravděpodobnost přenesení mikrosatelitů. Přenos mikrosatelitů na všechny studované druhy se podařil v 35,3 % případů. Barbará et al. (2007) zaznamenali nižší úspěšnost přenosu u jednoletých samosprašných druhů. U jednotlivých druhů byla úspěšnost přenosu vyšší. U druhu *Ch. ficifolium*, jednoho z pravděpodobných rodičů *Ch. quinoa*, se mi jich podařilo přenést celkem 47 (69,11 %).

Specifičnost dvou lokusů u *Ch. ficifolium* jsem odhalila až testováním na reprezentativním vzorku jedinců, což dokazuje, jak je důležité před použitím mikrosatelitového setu na analýzy, udělat tzv. testovací analýzu na větším počtu jedinců, sesbíraných z širšího geografického území. Ovšem i přesto, že *Ch. quinoa* je příbuzný druh, se nepodařilo přenést ani na jeden studovaný druh z 68 vybraných lokusů celkem 9 lokusů, tedy v 13,2 % nebyl přenos vůbec úspěšný. Nakonec se mi podařilo sestavit funkční set mikrosatelitů z 12 lokusů, které jsem rozdělila do 3 multiplexů. Důvodem, proč jich bylo na analýzy nakonec použito jen 12, bylo více: (1) Některé z přenesených mikrosatelitů se ukázaly při prvním testování jako nevariabilní, (2) jejich délky alel byly velmi podobné a při PCR se překrývaly a (3) mikrosatelitové lokusy si v průběhu PCR

vzájemně konkurovaly. To je také důvod, proč bylo nutné mikrosatelitové lokusy rozdělit do 3 multiplexů, ačkoliv se tím zvýšila časová i finanční náročnost analýz. Vhodnost použití mikrosatelitového setu byla dána nejen variabilitou lokusů, ale i jejich 100% stabilitou při opakovaných analýzách.

Přenosem mikrosatelitových markerů se zabývali i Drašnarová et al. (2014), kteří se snažili přenést 39 mikrosatelitových markerů vyvinutých pro rod *Betula* L., *Alnus* Mill. a *Corylus* L. na *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. a *Alnus incana* (L.) Moench. Výsledkem bylo sestavení 2 multiplexů, z nichž první obsahoval 8 a druhý 9 mikrosatelitů, které byly stabilní a polymorfní. Stejně jako v mé studii tento set testovali na reprezentativním vzorku jedinců, v jejich případě na 200 jedincích z pěti odlišných lokalit. Vzhledem k tomu, že jejich studované druhy byly diploidní a tudíž mohli odečítat celý genotyp jedince, mohli druhy testovat pomocí analýz založených na odchylkách od Hardy-Weinbergovy rovnováhy či detekovat nulové alely a tzv. *large allele dropout* (viz kapitola 1.3.6). Tyto analýzy založené na přesné detekci genotypu jsem bohužel nedělala, vzhledem k tomu, že 3 druhy v mé studii byly polyploidní. I proto, jsem testovala datový soubor různými statistickými přístupy, abych zjistila, do jaké míry jsou zjištěné výsledky důvěryhodné.

5.2 GENETICKÁ DIVERZITA STUDOVANÝCH DRUHŮ

Ze studie vyplynulo, že genetická diferenciacce mezi jedinci je úzce spjata s druhovou příslušností a stupněm ploidie. O tom vypovídá i počet detekovaných alel, který byl u polyploidních druhů o více než polovinu vyšší (obrázek 5 a 7). Studované druhy skupiny *Chenopodium album* jsou mezi sebou značně diferencované, o tom svědčí výsledky analýzy molekulární variance, která ukázala na cca 80 % mezidruhové diferenciacce a to i přesto, že se druhy vyskytovaly na lokalitách společně (tabulka 10 a 12). Z výsledků tedy plyne, že taxony skupiny *Ch. album* je oprávněné považovat za samostatné druhy, přestože jsou si morfologicky mnohdy velmi podobní (Dostálek et al. 1990). V rámci druhů byla variabilita poměrně nízká cca 20 %, z čehož plyne, že jednotlivé druhy jsou v přírodě dobře vymezené, především mezi ploidními úrovněmi a genový tok je mezi ploidními velmi vzácný. To také ukazuje Mandák et al. (2012), kteří mezi studovanými druhy nenašli žádné triploidní ani pentaploidní jedince. Výsledky z PCoA také potvrdily diferencovanost různých ploidních úrovní a především velkou genetickou odlišnost mezi diploidními a polyploidními druhy (obrázek 21 a 22).

Indexy genetické diverzity potvrdily diferencovanost především u druhů různých ploidií, kde diverzita polyploidních druhů oproti diploidním druhům byla až o řád vyšší. Hodnoty indexů genetické diverzity hexaploidního *Ch. album* byly ve srovnání s druhy *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum* až trojnásobně vyšší (tabulka 13). Tento markantní rozdíl mezi ploidie mi si lze vysvětlit (1) zastoupením pouze dvou alel v genotypu u diploidních druhů a naopak u hexaploidního druhu *Ch. album* šesti alelami v genotypu a také kombinací více genomů u *Ch. album*. (2) Nižší variabilita a diverzita diploidních druhů *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum* vypovídá o jejich vysoké míře samosprašnosti. Hamrick a Godt (1996) ukázali, že právě rozmnožovací systém značně ovlivňuje míru genetické diverzity. V celé čeledi *Chenopodiaceae*, kde se vyskytuje velké množství samosprašných druhů, nalézáme nízkou genetickou diverzitu v rámci druhů a taktéž nejméně polymorfních lokusů na druh. V rámci druhů pak zaznamenali vysokou genetickou diverzitu mezi populacemi a poměrně nízkou uvnitř populací. Nízká genetická diverzita v rámci druhu byla detekována i u příbuzného jednoletého diploidního druhu *Atriplex tatarica* L., která byla odhadována na základě isoenzymů (Mandák et al. 2005). Nízkou variabilitu u tohoto druhu, způsobenou právě vysokou mírou samosprašnosti, odhalili analýzou 25 populací z území ČR. I přes použití dnes již překonané metody, mohli poskytnout reprezentativní výsledky založené na kodominantním charakteru isoenzymů, tedy odečtu celého genotypu jedinců.

Genetická diverzita a divergence mezi lokalitami (tabulka 15) byla shodná a nízká, přičemž jsem pro žádnou lokalitu nedetekovala žádnou unikátní alelu napříč všemi druhy, což svědčí o tom, že mezi lokalitami poměrně běžně dochází k migraci jedinců a vzdálenost, alespoň mezi studovanými lokalitami, zde nehraje žádnou roli. To je dáno schopností přenosu pylu na velké vzdálenosti a také snadným šířením semen např. transferem zeminy z opakovaně narušovaných stanovišť. Prostorová bariéra tedy nebrání potenciální hybridizaci mezi druhy, alespoň co se týče stejné ploidní úrovně. Z celkového hlediska jsou rozdíly v indexech diverzity mezi druhy příliš nízké, aby se z nich daly vyvozovat nějaké přesnější závěry. Slouží tedy pouze pro zevrubnou představu genetické struktury mezi druhy. Především výsledky z území ČR je nutné brát s velkou opatrností, jelikož pro spolehlivou interpretaci indexů diverzity by bylo potřeba mít v analýzách zastoupeno více populací ze širšího území. To se také potvrdilo při analýze 142 jedinců z geograficky širšího území, kdy hodnoty DW indexu byly až 4× vyšší, oproti indexům zjištěných analýzou populací pocházející jen z území ČR. Celkově nízké hodnoty indexů diverzity mohou být také způsobeny sdílením mnoha alel mezi druhy.

5.3 HOMOPLOIDNÍ HYBRIDIZACE V RÁMCI STUDOVANÝCH DRUHŮ

Analýza mikrosatelitů pomocí Baeysiánské metody se ukázala jako vhodná pro rozlišení druhů stejné ploidní úrovně a pro detekci hybridních jedinců v rámci diploidních i tetraploidních druhů. Existenci kříženců jsem v některých případech byla schopna následně potvrdit i pomocí analýzy hlavních koordinát.

DIPLOIDNÍ DRUHY

I přesto, že jsou diploidní druhy *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum* dobře morfologicky i geneticky diferencované a tvoří dvě čisté linie, podařilo se mi detekovat pomocí STRUCTURE 13 hybridních jedinců ze tří různých lokalit, což ukazuje na potenciál genového toku mezi těmito druhy (obrázek 11). Genetická příbuznost obou druhů je patrná i na obrázku 22, kdy v PCoA analýze se všemi druhy, vytvořily diploidní druhy izolovaný klastř a pravděpodobní kříženci se buď vyskytovaly na rozhraní skupiny *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum*, nebo ve shluku jedinců druhého druhu. V přírodě jsou tyto druhy od sebe morfologicky dobře rozlišené, přičemž kříženec *Ch. × gruellii* Aellen sdílí morfologické znaky obou rodičů (Aellen 1971–1972). Nejen morfologická podobnost tohoto křížence, ale i společný výskyt s rodičovskými druhy vede k tomu, že se v rámci populace jedná o často přehlížený taxon. Dle Mandáka et al. (nepublikovaná data) F1 generace těchto kříženců vzniká na lokalitách recentně, ovšem tyto kříženci jsou méně plodní a potomci málo životaschopní. Vzhledem k tomu, že o kříženci *Ch. × gruellii* máme stále k dispozici minimum údajů, je nutná další studie, která by ukázala četnost výskytu tohoto taxonu v přírodě. Dvořák (1992) ve své studii tvrdí, že *Ch. × gruellii* vzniká hybridizací *Ch. ficifolium* a *Ch. pseudoopulifolium*, přičemž *Ch. × gruellii* se ještě může následně křížit s *Ch. pseudostriatum* (Zchacke) Murr za vzniku *Ch. subopulifolium* Murr emend. Dvořák. Uotila (1978, 2001) také připouští možnost hybridizace mezi *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum*, ale tohoto křížence zde uvádí jako *Ch. pseudoficifolium* Murr, který z morfologického hlediska kombinuje znaky rodičovských druhů. Avšak kvůli nedostatku dat z cytologických a molekulárních analýz se domnívá, že *Ch. pseudoficifolium* může být jen jedna z forem *Ch. album*.

TETRAPLOIDNÍ DRUHY

Analýzou mikrosatelitů pomocí STRUCTURE jsem poprvé ukázala, že tetraploidní druhy *Ch. strictum* a *Ch. striatiforme* spolu mohou hybridizovat (obrázek 13). Díky morfologické blízkosti jsou tyto kříženci v přírodě přehlíženi, a proto také o těchto křížencích doposud není v literatuře žádný záznam. Celkem se mi podařilo detekovat 7 hybridních jedinců, přičemž 6 kříženců původně určených jako *Ch. strictum* se nacházelo na lokalitě Podbořany. Detekovaný kříženec na lokalitě Hostivice, původně určený jako *Ch. strictum*, který tvořil na této lokalitě celou populaci, potvrdil svoji intermediální pozici i na fylogenetickém stromě (obrázek 28), kde se umístil na větev do blízkosti *Ch. striatiforme*. Ostatní detekovaní hybridní jedinci z lokality Podbořany vytvořili jednu samostatnou menší větev v rámci větve *Ch. strictum*. Detekce kříženců je o to více zajímavá, že fenologie kvetení *Ch. strictum* je o cca 2 měsíce posunuta, oproti *Ch. striatiforme*. Některé podobné taxony, které by mohly mít původ právě křížením *Ch. strictum* a *Ch. striatiforme*, byly zaznamenány na území Evropy. Ovšem vzhledem k absenci herbářových položek a experimentálních pokusů hybridizace mezi *Ch. strictum* a *Ch. striatiforme*, se můžeme jen domnívat, že se jednalo o křížence (Aellen and Just 1943; Dvořák 1989b).

5.4 O PŮVODU *CHENOPODIUM ALBUM*

Pro odhalení recentně vzniklých hexaploidních jedinců *Ch. album* jsem využila vysoké mutační rychlosti mikrosatelitů. Předpokládala jsem, že druh *Ch. album* vznikl kdysi dávno z diploidních a tetraploidních druhů a měl určitou sadu alel. V průběhu času pak mutacemi došlo ke změně délek jednotlivých alel v rámci *Ch. album* a tento stav dnes můžeme pozorovat v současných populacích. Mikrosatelitové lokusy jejich rodičovských diploidních a tetraploidních druhů prošly stejným náhodným mutačním procesem. Pokud tedy hexaploidní *Ch. album* vzniká na lokalitách i recentně, pak můžeme odůvodněně předpokládat, že recentní kříženci budou sdílet alely s diploidními a tetraploidními rodiči a ne s hexaploidními jedinci, kteří vznikli v minulosti. Tímto způsobem můžeme oddělit recentně vzniklé jedince, od jedinců vzniklých v dávné minulosti.

Dávno vzniklé křížence bylo při analýze pomocí STRUCTURE (obrázek 9) možné detekovat ve formě samostatného genetického klastru. Kdyby se na výstupu ze STRUCTURE rozlišila pouze tato čistá linie, tak by to znamenalo, že v současné době už

ke genovému toku mezi ploidiemi nedochází. Takovým příkladem absence toku genů mezi ploidiemi může být studie Münzbergové et al. (2013), kteří zkoumali výměnu genů mezi diploidními a hexaploidními jedinci skupiny *Aster amellus*, kteří jsou z morfologického hlediska prakticky nerozlišitelní. Ve střední Evropě mají tyto dva cytotypy kontaktní zónu v Polsku, České republice, Slovensku, Rakousku a Rumunsku. Při porovnání jejich stanovištních podmínek zde nejsou žádné bariéry a oba druhy tedy mohou růst pohromadě. Stejně jako v mé studii využili pro detekci případných recentních kříženců mikrosatelitové markery. Jejich výsledky ovšem ukázali na jasnou genetickou separaci obou cytotypů. Dospěli k závěru, že studované kontaktní zóny jsou sekundárního původu a diploidní a hexaploidní cytotypy *Aster amellus* jsou do značné míry dva nezávislé subjekty.

Na druhou stranu jsem předpokládala, že pokud se současné populace skládají pouze z recentních hexaploidních kříženců, pak tito jedinci budou obsahovat pouze sady alel z druhů, ze kterých vznikly recentně. Výsledky analýz by tedy vypadaly tak, že hexaploidní *Ch. album* nebude vytvářet samostatnou genetickou entitu, ale bude kombinovat genomy a tedy i alely svých rodičů.

Z výsledků analýz je patrné, že současné populace jsou složeny pravděpodobně jak z dávných, tak z recentních kříženců (obrázek 9). Detekce recentních kříženců byla podpořena i analýzou pouze hexaploidních populací, kde se pro hexaploidní křížence rozlišila samostatná linie (obrázek 15). Recentní vznik je patrný i z analýzy hlavních koordinát (obrázek 22), kde se pravděpodobní recentní kříženci rozlišili mezi skupinou jedinců *Ch. album* a *Ch. striatiforme*. Výstupy z analýz potvrdily výsledky předcházejících studií, poukazující na alopolyploidní původ *Ch. album* (Gangopadhyay et al. 2002; Mandák et al. 2012). Hypotéza vzniku z diploidních a tetraploidních druhů splynutím neredukovaných gamet podle Mandáka et al. (2012), se tedy při analýzách potvrdila na základě konzistentních výsledků při použití různých analytických přístupů. Mandák et al. (2012) ovšem při experimentálním křížení nenašli žádného triploidního křížence mezi diploidními a tetraploidními druhy, tudíž se domnívali, že k volnému křížení mezi druhy nedochází.

Moje studie ukázala, že na území ČR k recentnímu vzniku *Ch. album* může pravděpodobně docházet, i když velmi vzácně, což podporuje obecnou hypotézu, o opakovaném vzniku polyploidních druhů (Soltis et al. 2009b). Příkladem recentního vzniku druhu za účasti hybridizace a polyploidizace mohou být taxony *Tragopogon mirus* a *T. miscellus*, alotetraploidní „druhy“, které vznikly v posledních 80 letech opakovaně z diploidních předků (Al et al. 2004). Symonds et al. (2010) pomocí specificky vyvinutých

mikrosatelitů pro rodičovské druhy *T. dubius*, *T. pratensis* a *T. porrifolius*, detekovali nově vzniklé křížence a potvrdili tak opakovaný vznik těchto taxonů.

Bohužel díky rozdělení genetických klastrů dle ploidních úrovní, nebylo možné pomocí Bayesýánské analýzy (obrázek 9) přesně určit rodičovské druhy, které se na jeho vzniku podílejí. Přestože STRUCTURE nebyl schopen určit přesnou rodičovskou kombinaci, ostatní analýzy velmi přesvědčivě ukazují, že tetraploidní rodič *Ch. album* je pravděpodobně *Ch. striatiforme* (obrázek 22 a 28). Celková blízkost mezi těmito druhy vyplývá už z množství detekovaných společných alel na území ČR (příloha č. 3), kterých bylo 27. Tento trend inklinace *Ch. striatiforme* k *Ch. album* lze vysledovat i z analýz PCoA, při které vždy recentní kříženci zaujali bližší pozici ke skupině jedinců *Ch. striatiforme*, přičemž skupina jedinců *Ch. strictum* byla ve větší vzdálenosti od jedinců *Ch. album*. Na fylogenetickém stromě (obrázek 28) se dokonce rozlišila samostatná větev *Ch. striatiforme* s *Ch. album*. Na tomto stromě jsou také recentní kříženci jasně detekovatelní, jelikož zaujali intermediární pozici na bázi hlavní větve. Další fakt, který nepřímo podporuje hypotézu, že druh *Ch. striatiforme* je jeden z rodičů *Ch. album*, je v podstatě jeho shodná fenologie kvetení s diploidními druhy. Oproti tomu, tetraploidní druh *Ch. strictum* kvete cca o 2 měsíce později (srpen–září). Fenologie kvetení tedy pravděpodobně funguje jako jedna z reprodukčních bariér.

V přirozeném prostředí se ovšem nenachází pouze F1 generace recentně vzniklých kříženců, ale z výsledků analýz lze vyvodit, že tato F1 generace je fertilní a je pravděpodobně schopna se dále zpětně křížit s dávno vzniklými hexaploidními kříženci. To se projevilo na výstupu z analýzy pomocí STRUCTURE, kde v genetickém klastru hexaploidních jedinců, jsem detekovala jedince, kteří obsahovali buď jen diploidní či jen tetraploidní genetický klast (obrázek 9).

Z ekologického hlediska se tyto 3 typy uvedených kříženců (dávni kříženci, recentní F1 a další generace kříženců) neliší, protože se na našem území běžně vyskytují pospolu na jedné lokalitě. Díky kombinaci více genomů a velké fenotypové plasticitě jednotlivých jedinců, se při morfologickém porovnání dávných a recentních kříženců nedal vypořádat žádný trend a tudíž recentní kříženci jsou z morfologického hlediska od dávných kříženců obtížně rozeznatelní. Nutno ale podotknout, že moje diplomová práce nebyla zaměřena na morfometrickou analýzu a není tedy možné vyloučit, že jednotlivé skupiny v rámci *Ch. album* lišící se původem, budeme schopni rozeznávat.

6 ZÁVĚR

Analýzou mikrosatelitů jsem zjistila, že na území České republiky dochází na společných lokalitách zástupců skupiny *Chenopodium album* k recentnímu vzniku hexaploidního druhu *Ch. album*. Vzhledem k detekci 8 recentně vzniklých F1 kříženců na čtyřech lokalitách, se jedná o vzácný jev. Ostatních 35 detekovaných kříženců jsou pravděpodobně pokročilí kříženci dávných a recentních F1 kříženců. Dnešní populace druhů tedy představují směs jak dávným kříženců, tak F1 generace recentně vzniklých kříženců, které vznikají ze současných populací diploidních druhů *Ch. ficifolium* či *Ch. suecicum* a pravděpodobně tetraploidního druhu *Ch. striatiforme*. Tito kříženci se pravděpodobně dále mohou křížit s dávnými a recentními kříženci F1 generace.

Při analýze jednotlivých ploidních úrovní se mi podařilo detekovat i křížence mezi diploidními a poté i mezi tetraploidními druhy. Celkem jsem na třech studovaných lokalitách odhalila 13 hybridních jedinců mezi diploidními druhy *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum*. Vzhledem ke společnému výskytu s rodičovskými druhy, je tento kříženec *Ch. × gruellii* v přírodě často přehlížený a povědomí o jeho četnosti v přírodě je minimální. Mnoho otázek vyvstalo objevem hybridních jedinců mezi tetraploidními druhy *Ch. strictum* a *Ch. striatiforme*, přičemž jde o první důkaz možnosti hybridizace mezi těmito druhy. Jelikož o tomto kříženci nejsou v současné době žádné záznamy v literatuře, je více než nutná další studie na toto téma.

I přesto, že studované druhy jsou geneticky dobře vymezeny, genetické důsledky mezidruhové hybridizace nejsou známy. Patrným důsledkem alopolyploidního vzniku *Ch. album* je přítomnost mnoha polymorfních lokusů oproti nižším ploidním úrovním a vysoká morfologická variabilita daná kombinací odlišných genomů. V oblasti recentního vzniku *Ch. album* také zůstává mnoho nezodpovězených otázek. Nejzásadnější otázka je, jaký diploidní druh se na vzniku recentního *Ch. album* podílí. Vzhledem k tomu, že v této studii pocházeli recentní kříženci z velmi geograficky blízkých lokalit, bylo by také vhodné tuto studii rozšířit na území celé Evropy popř. zahrnout do analýz druhy pocházející z Asie, odkud tetraploidní druhy pravděpodobně pocházejí.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abbott, R. J., Albach, D., Ansell, S., Arntzen, J. W., Baird, S. J. E., Bierne, N., Boughman, J., Brelsford, A., Buerkle, C. A., Buggs, R., Butlin, R. K., Dieckmann, U., Eroukhmanoff, F., Grill, A., Cahan, S. H., Hermansen, J. S., Hewitt, G., Hudson, A. G., Jiggins, C., Jones, J., Keller, B., Marczewski, T., Mallet, J., Martinez-Rodriguez, P., Möst, M., Mullen, S., Nichols, R., Nolte, A. W., Parisod, C., Pfennig, K., Rice, A. M., Ritchie, M. G., Seifert, B., Smadja, C. M., Stelkens, R., Szymura, J. M., Väinölä, R., Wolf, J. B., & Zinner, D. (2013). Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, 26(2), 229–246.
- Abbott, R. J., Hegarty, M. J., Hiscock, S. J., & Brennan, A. C. (2010). Homoploid hybrid speciation in action. *Taxon*, 59(5), 1375–1386.
- Abbott, R. J., & Lowe, A. J. (2004). Origins, establishment and evolution of new polyploid species: *Senecio cambrensis* and *S. eboracensis* in the British Isles. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(4), 467–474.
- Abdelkrim, J., Robertson, B. C., Stanton, J. A. L., & Gemmell, N. J. (2009). Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *BioTechniques*, 46(3), 185–192.
- Adams, K. L., & Wendel, J. F. (2004). Exploring the genomic mysteries of polyploidy in cotton. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(4), 573–581.
- Adams, K. L., & Wendel, J. F. (2005). Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(2), 135–141.
- Aellen, P. (1960). *Chenopodium*. In G. Hegi (Ed.), *Illustrierte Flora von Mitteleuropa* 3/2 (pp. 569–659). München: Carl Hanser-Verl.
- Aellen, P. (1971–1972). Das vorkommen einer neuen hybride von *Chenopodium ficifolium* Sm. × *Chenopodium viride* L. (*Chenopodium* × *gruellii* Aellen hybr. nov.) in der ČSSR. *Acta Musei Moraviae, Scientiae naturales*, 56–57, 167–170.
- Aellen, P., & Just, T. (1943). Key and synopsis of the American species of the genus *Chenopodium* L. *American Midland Naturalist*, 30(1), 47–76.
- Ainouche, M. L., Baumel, A., & Salmon, A. (2004). *Spartina anglica* C. E. Hubbard: a natural model system for analysing early evolutionary changes that affect allopolyploid genomes. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(4), 475–484.
- Akeroyd, J. (1993). *Chenopodium* L. In T. G. Tutin, V. Heywood, A. Burges, & D. Valentine (Eds.), *Flora Europaea*, Ed. 2, Vol. 1. (pp. 11–114). Cambridge: Cambridge University Press.

- Al, E. T., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Pires, J. C., Kovarik, A., Tate, J. A., & Mavrodiev, E. (2004). Recent and recurrent polyploidy in *Tragopogon* (Asteraceae): cytogenetic, genomic and genetic comparisons. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(4), 485–501.
- APG I. (1998). An Ordinal Classification for the Families of Flowering Plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 85(4), 531–553.
- APG III. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 105–121.
- Arnold, M. L., Bulger, M. R., Burke, J. M., Hempel, A. L., & Williams, J. H. (1999). Natural Hybridization: How Low Can You Go and Still Be Important? *Ecology*, 80(2), 371–381.
- Arriola, P. E., & Ellstrand, N. C. (1996). Crop-To-Weed Gene Flow in the Genus *Sorghum* (Poaceae): Spontaneous Interspecific Hybridization between Johnsongrass, *Sorghum halepense*, and Crop *Sorghum*, *S. Bicolor*. *American Journal of Botany*, 83(9), 1153–1160.
- Baillon, H. (1887). *Histoire des Plantes* (p. 488). Paris: Librairie Hachette.
- Baloux, F., & Lugon-Moulin, N. (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11, 155–165.
- Barbará, T., Palma-Silva, C., Paggi, G. M., Bered, F., Fay, M. F., & Lexer, C. (2007). Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: Potential and limitations. *Molecular Ecology*, 16(18), 3759–3767.
- Bennett, M. D. (2004). Perspectives on polyploidy in plants – ancient and neo. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(4), 411–423.
- Bhargava, A., Shukla, S., & Ohri, D. (2006). *Chenopodium quinoa* – An Indian perspective. *Industrial Crops and Products*, 23(1), 73–87.
- Brownfield, L., & Köhler, C. (2011). Unreduced gamete formation in plants: mechanisms and prospects. *Journal of Experimental Botany*, 62(5), 1659–1668.
- Bruvo, R., Michiels, N. K., D'Sousa, T. G., & Schulenberg, H. (2004). A simple method for calculation of microsatellite genotypes irrespective of ploidy level. *Molecular Ecology*, 13(7), 2101–2106.
- Calabrese, P. P., Durrett, R. T., & Aquadro, C. F. (2001). Dynamics of microsatellite divergence under stepwise mutation and proportional slippage/point mutation models. *Genetics*, 159(2), 839–852.
- Clark, L. V., & Jasieniuk, M. (2011). POLYSAT: an R package for polyploid microsatellite analysis. *Molecular Ecology Resources*, 11(3), 562–566.

- Cole, M. J. (1957). Variation and interspecific relationships of *Chenopodium album* L. in Britain. *Ph.D. Thesis*. University of Southampton.
- Cole, M. J. (1961). Interspecific relationships and intraspecific variation of *Chenopodium album* L. in Britain. I. The taxonomic delimitation of the species. *Watsonia*, 5(2), 47–58.
- Corander, J., & Marttinen, P. (2006). Bayesian identification of admixture events using multi-locus molecular markers. *Molecular Ecology*, 15(10), 2833–2843.
- Dakin, E. E., & Avise, J. C. (2004). Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93(5), 504–509.
- Dieringer, D., & Schlötterer, C. (2003). Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes*, 3(1), 167–169.
- Dostálek, J., Hejný, S., Husák, Š., Schwarzová, T., & Dvořák, F. (1990). *Chenopodium* L. In S. Hejný & B. Slavík (Eds.), *Květena České republiky 2* (pp. 223–265). Praha: Academia.
- Drašnarová, A., Krak, K., Vít, P., Doudová, J., Douda, J., Hadincová, V., Zákravský, P., & Mandák, B. (2014). Cross-amplification and multiplexing of SSR markers for *Alnus glutinosa* and *A. incana*. *Tree Genetics & Genomes*, 10(4), 865–873.
- Dufresne, F., Stift, M., Vergilino, R., & Mable, B. K. (2014). Recent progress and challenges in population genetics of polyploid organisms: an overview of current state-of-the-art molecular and statistical tools. *Molecular Ecology*, 23(1), 40–69.
- Dvořák, F. (1989a). Study of some taxa from the range of *Chenopodium ficifolium* Sm. *Feddes Repertorium*, 100, 455–479.
- Dvořák, F. (1989b). Study on *Chenopodium strictum* agg. *Feddes Repertorium*, 100(9-10), 197–234.
- Dvořák, F. (1992). Study of *Chenopodium subopulifolium* J. Murr emend. D. *Feddes Repertorium*, 103(1-2), 49–69.
- Dvořák, F., Dadáková, B., & Grüll, F. (1983). A contribution to the study of *Chenopodium album* agg. *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica*, 18(1), 29–43.
- Ehrich, D. (2006). AFLPdat: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data. *Molecular Ecology Notes*, 6(3), 603–604.
- Ehrich, D., Gaudeul, M., Assefa, A., Koch, M., Mummenhoff, K., Nemomissa, S., Intrabiodiv Consortium, & Brochmann, C. (2007). Genetic consequences of Pleistocene range shifts: contrast between the Arctic, the Alps and the East African mountains. *Molecular Ecology*, 16(12), 2542–2559.

- Ellegren, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5(6), 435–445.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564–567.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics*, 131(2), 479–491.
- Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164(4), 1567–1587.
- Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 574–578.
- Fuentes-Bazan, S., Mansion, G., & Borsch, T. (2012a). Towards a species level tree of the globally diverse genus *Chenopodium* (Chenopodiaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62(1), 359–374.
- Fuentes-Bazan, S., Uotila, P., & Borsch, T. (2012b). A novel phylogeny-based generic classification for *Chenopodium* sensu lato, and a tribal rearrangement of Chenopodioideae (Chenopodiaceae). *Willdenowia*, 42(1), 5–24.
- Gangopadhyay, G., Das, S., & Mukherjee, K. K. (2002). Speciation in *Chenopodium* in West Bengal, India. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 49, 503–510.
- Goodman, S. J. (1997). RST Calc: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance. *Molecular Ecology*, 6(9), 881–885.
- Graebner, P. (1919). *Chenopodium*. In P. Ascherson & P. Graebner (Eds.), *Synopsis der mitteleuropäischen Flora* (pp. 17–106). Leipzig: Gebrüder Borntraeger.
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F., & Petit, R. J. (2011). Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, 11(4), 591–611.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 1–9.

- Hamrick, J. L., & Godt, J. W. (1996). Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Science*, 351(1345), 1291–1298.
- Hardy, O. J. H., & Vekemans, X. V. (2002). SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, 2, 618–620.
- Henry, I. M., Dilkes, B. P., Young, K., Watson, B., Wu, H., & Comai, L. (2005). Aneuploidy and genetic variation in the *Arabidopsis thaliana* triploid response. *Genetics*, 170(4), 1979–1988.
- Hoshino, A. A., Bravo, J. P., Nobile, P. M., & Morelli, K. A. (2012). Microsatellites as Tools for Genetic Diversity Analysis. In Mahmut Caliskan (Ed.), *Genetic Diversity in Microorganisms* (p. 382). Croatia: InTech.
- Hubisz, M. J., Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9(5), 1322–1332.
- Husband, B. C. (2004). The role of triploid hybrids in the evolutionary dynamics of mixed-ploidy populations. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(4), 537–546.
- Chapman, M. A., & Abbott, R. J. (2010). Introgression of fitness genes across a ploidy barrier. *New Phytologist*, 186(1), 63–71.
- Chelaifa, H., Monnier, A., & Ainouche, M. (2010). Transcriptomic changes following recent natural hybridization and allopolyploidy in the salt marsh species *Spartina* × *townsendii* and *Spartina anglica* (Poaceae). *New Phytologist*, 186(1), 161–174.
- Chen, Z. J., Wang, J., Tian, L. U., Lee, H., Wang, J. J., Chen, M., Lee, J. J., Josefsson, C., Madlung, A., Watson, B., Lippman, Z., Vaughn, M., Pires, J. C., Colot, V., Doerge, R. W., Martienssen, R. A., Comai, L., Osborn, T. C., & Osborn, T. C. (2004). The development of an *Arabidopsis* model system for genome-wide analysis of polyploidy effects. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(4), 689–700.
- Chistiakov, D. A., Hellemans, B., & Volckaert, F. a. M. (2006). Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 255(1-4), 1–29.
- Jaccard, P. (1901). Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. *Bulletin de La Société Vaudoise Des Sciences Naturelles*, 37, 547–79.
- Jacobsen, S. E. (2011). The Situation for Quinoa and Its Production in Southern Bolivia: From Economic Success to Environmental Disaster. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 197(5), 390–399.
- Jaillon, O., Aury, J.-M., & Wincker, P. (2009). "Changing by doubling", the impact of Whole Genome Duplications in the evolution of eukaryotes. *Comptes Rendus Biologies*, 332(2-3), 241–253.

- Jakobsson, M., & Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23(14), 1801–1806.
- James, J. K., & Abbott, R. J. (2005). Recent, allopatric, homoploid hybrid speciation: the origin of *Senecio squalidus* (Asteraceae) in the British Isles from a hybrid zone on Mount Etna, Sicily. *Evolution*, 59(12), 2533–2547.
- Jarne, P., & Lagoda, P. J. L. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(10), 424–429.
- Jarvis, D. E., Kopp, O. R., Jellen, E. N., Mallory, M. a, Pattee, J., Bonifacio, A., Coleman C. E., Stevens, M. R., Fairbanks, D. J., & Maughan, P. J. (2008). Simple sequence repeat marker development and genetic mapping in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Genetics*, 87(1), 39–51.
- Judd, W. S., Campbell, Christopher S. Kellogg, E. A., & Stevens, P. F. (1999). *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*. (W. S. Judd, Ed.) (p. 464). USA: Sinauer Associates.
- Kadereit, G., Borsch, T., Weising, K., & Freitag, H. (2003). Phylogeny of Amaranthaceae and Chenopodiaceae and the evolution of C4 photosynthesis. *International Journal of Plant Sciences*, 164(6), 959–986.
- Kadereit, G., Mavrodiev, E. V., Zacharias, E. H., & Sukhorukov, A. P. (2010). Molecular phylogeny of Atripliceae (Chenopodioideae, Chenopodiaceae): Implications for systematics, biogeography, flower and fruit evolution, and the origin of C4 photosynthesis. *American Journal of Botany*, 97(10), 1664–1687.
- Kashi, Y., & King, D. (2006). Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. *Trends in Genetics*, 22(5), 253–259.
- Katti, M. V, Ranjekar, P. K., & Gupta, V. S. (2001). Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 18(7), 1161–1167.
- Kimura, M., & Ohta, T. (1978). Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(6), 2868–2872.
- Köhler, C., Mittelsten, S. O., & Erilova, A. (2010). The impact of the triploid block on the origin and evolution of polyploid plants. *Trends in Genetics*, 26(3), 142–148.
- Kolano, B., Siwinska, D., & Maluszynska, J. (2008). Comparative cytogenetic analysis of diploid and hexaploid *Chenopodium album* agg. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 77(4), 293–298.
- Kühn, U., Bittrich, V., Carolin, R., Freitag, H., Hedge, I. C., Uotila, P., Wilson, P. G. (1993). Chenopodiaceae. In K. Kubitzki (ed.), *Families and genera of vascular plants*. Vol 2. (pp. 253–281). Berlin: Springer.

- Levin, D. A. (1975). Minority cytotype exclusion in local plant populations. *Taxon*, 24(1), 35–43.
- Levinson, G., & Gutman, G. A. (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 4(3), 203–221.
- Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A., & Nevo, E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11(12), 2453–2465.
- Lim, K. Y., Matyášek, R., Kovařík, A., & Leitch, A. R. (2004). Genome evolution in allotetraploid *Nicotiana*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(4), 599–606.
- Linnaeus, C. (1753). *Species plantarum, exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas*. Stockholm: Laurentii Salvii.
- Lipman, M. J., Chester, M., Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2013). Natural hybrids between *Tragopogon mirus* and *T. miscellus* (Asteraceae): a new perspective on karyotypic changes following hybridization at the polyploid level. *American Journal of Botany*, 100(10), 2016–2022.
- Luikart, G., & England, P. R. (1999). Statistical analysis of microsatellite DNA data. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(7), 253–256.
- Lynch, M. (1990). The similarity index and DNA fingerprinting. *Molecular Biology and Evolution*, 7(5), 478–484.
- Mable, B. K. (2004). ‘Why polyploidy is rarer in animals than in plants’: myths and mechanisms. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(4), 453–466.
- Mallet, J. (2007). Hybrid speciation. *Nature*, 446, 279–283.
- Mallet, J. (2008). Hybridization, ecological races and the nature of species: empirical evidence for the ease of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1506), 2971–2986.
- Mandák, B., Bímová, K., Placková, I., Mahelka, V., & Chrtek, J. (2005). Loss of genetic variation in geographically marginal populations of *Atriplex tatarica* (Chenopodiaceae). *Annals of Botany*, 96(5), 901–912.
- Mandák, B., Trávníček, P., Paštová, L., & Kořínková, D. (2012). Is hybridization involved in the evolution of the *Chenopodium album* aggregate? An analysis based on chromosome counts and genome size estimation. *Flora*, 207(7), 530–540.
- Mandáková, T., Joly, S., Krzywinski, M., Mummenhoff, K., & Lysák, M. A. (2010). Fast Diploidization in Close Mesopolyploid Relatives of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 22(7), 2277–2290.

- Manly, B. F. J. (2004). *Multivariate Statistical Methods: A Primer, Third Edition* (p. 224). Florida: Chapman and Hall/CRC.
- Martin, S. M., & Husband, B. C. (2009). Influence of phylogeny and ploidy on species ranges of North American angiosperms. *Journal of Ecology*, 97(5), 913–922.
- Mason, S. L., Stevens, M. R., Jellen, E. N., Bonifacio, A., Fairbanks, D. J., Coleman, C. E., McCarty, R. R., Rasmussen, A. G., & Maughan, P. J. (2005). Development and Use of Microsatellite Markers for Germplasm Characterization in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Crop Science Society of America*, 45(4), 1618–1630.
- Meirmans, P. G., & Van Tienderen, P. H. (2013). The effects of inheritance in tetraploids on genetic diversity and population divergence. *Heredity*, 110(2), 131–137.
- Michener, C. D., & Sokal, R. R. (1957). A quantitative approach to a problem of classification. *Evolution*, 11(2), 130–162.
- Müller, K., & Borsch, T. (2005). Phylogenetics of Amaranthaceae Based on *matK/trnK* Sequence Data: Evidence from Parsimony, Likelihood, and Bayesian Analyses. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 92(1), 66–102.
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335–350.
- Münzbergová, Z., Šurinová, M., & Castro, S. (2013). Absence of gene flow between diploids and hexaploids of *Aster amellus* at multiple spatial scales. *Heredity*, 110(2), 123–130.
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics* (p. 512). New York: Columbia University Press.
- Nordborg, M., Hu, T. T., Ishino, Y., Jhaveri, J., Toomajian, C., Zheng, H., Bakker, E., Calabrese, P., Gladstone, J., Goyal, R., Jakobsson, M., Kim, S., Morozov, Y., Padhukasahasram, B., Plagnol, V., Rosenberg, N. A., Shah, C., Wall, J. D., Wang, J., Zhao, K., Kalbfleisch, T., Schulz, V., Kreitman, M., & Bergelson, J. (2005). The Pattern of Polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biology*, 3(7), 1289–1299.
- Ohta, T., & Gillespie, J. (1996). Development of Neutral and Nearly Neutral Theories. *Theoretical Population Biology*, 49(2), 128–142.
- Oswald, B. P., & Nuismer, S. L. (2007). Neopolyploidy and pathogen resistance. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1624), 2393–2397.
- Ownbey, M. (1950). Natural hybridization and amphiploidy in the genus *Tragopogon*. *American Journal of Botany*, 37(7), 487–499.
- Pandey, M., & Sharma, J. (2012). Efficiency of microsatellite isolation from orchids via next generation sequencing. *Open Journal of Genetics*, 2(4), 167–172.

- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155(2), 945–959.
- R Core Team. (2014). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: the R Foundation for Statistical Computing. Available online at <http://www.R-project.org/>.
- Rahiminejad, M. R. (1995). *Taxonomy and biosystematics of the Chenopodium album aggregate*. PhD. Thesis. University of Leicester.
- Rahiminejad, M. R., & Gornall, R. J. (2004). Flavonoid evidence for allopolyploidy in the *Chenopodium album* aggregate (Amaranthaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 246(1), 77–87.
- Ramsey, J. (2007). Unreduced gametes and neopolyploids in natural populations of *Achillea borealis* (Asteraceae). *Heredity*, 98(3), 143–150.
- Ramsey, J., & Schemske, D. W. (1998). Pathways, Mechanisms, and Rates of Polyploid Formation in Flowering Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29, 467–501.
- Rieseberg, L. H. (1997). Hybrid Origins of Plant Species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 28, 359–389.
- Rieseberg, L. H., Raymond, O., Rosenthal, D. M., Lai, Z., Livingstone, K., Nakazato, T., Durphy, J. L., Schwarzbach, A. E., Donovan, L. A., & Lexer, C. (2003). Major Ecological Transitions in Wild Sunflowers Facilitated by Hybridization. *Science*, 301(5637), 1211–1216.
- Rieseberg, L. H., & Willis, J. H. (2007). Plant speciation. *Science*, 317(5840), 910–914.
- Rodman, J. E. (1990). Centrospermae Revisited , Part I. *Taxon*, 39(3), 383–393.
- Rosenberg, N. A. (2004). DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4, 137–138.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425.
- Scott, A. J. (1978). A review of the classification of *Chenopodium* L. and related genera (Chenopodiaceae). *Botanische Jahrbücher Für Systematik*, 100, 205–220.
- Semagn, K., Bjørnstad, Å., & Ndjioudjop, M. N. (2006). An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(25), 2540–2568.
- Schlötterer, C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109(6), 365–371.
- Schlüter, P. M., & Harris, S. A. (2006). Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Molecular Ecology Notes*, 6(2), 569–572.

- Schönswetter, P., & Tribsch, A. (2005). Vicariance and dispersal in the alpine perennial *Bupleurum stellatum* L. (Apiaceae). *Taxon*, 54(3), 725–732.
- Soltis, D. E., Albert, V. a, Leebens-Mack, J., Bell, C. D., Paterson, A. H., Zheng, C., Sankoff, D., Depamphilis, C. W., Wall, P. K., & Soltis, P. S. (2009a). Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany*, 96(1), 336–348.
- Soltis, D. E., Buggs, R. J. A., Barbazuk, W. B., Schnable, P. S., & Soltis, P. S. (2009b). On the origins of species: does evolution repeat itself in polyploid populations of independent origin? *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 74, 215–223.
- Soltis, D. E., Buggs, R. J. A., Doyle, J. J., & Soltis, P. S. (2010). What we still don't know about polyploidy. *Taxon*, 59(5), 1387–1403.
- Soltis, D. E., Visger, C. J., & Soltis, P. S. (2014). The polyploidy revolution then...and now: Stebbins revisited. *American Journal of Botany*, 101(7), 1–22.
- Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2009). The Role of Hybridization in Plant Speciation. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 561–588.
- Stace, C. A. (1975). *Chenopodium* L. In C. A. Stace (Ed.), *Hybridization and the flora of the British Isles* (pp. 179–184). London: Academic Press.
- Stebbins, G. L. (1947). Types of polyploids; their classification and significance. *Advances in Genetics*, 1, 403–429.
- Swigonova, Z., Lai, J., Ma, J., Ramakrishna, W., Llaca, V., Bennetzen, J. L., & Messing, J. (2004). On the tetraploid origin of the maize genome. *Comparative and Functional Genomics*, 5(3), 281–284.
- Symonds, V. V., Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2010). Dynamics of polyploid formation in *Tragopogon* (Asteraceae): recurrent formation, gene flow, and population structure. *Evolution*, 64(7), 1984–2003.
- Štorchová, H., Drabešová, J., Cháb, D., Kolář, J., & Jellen, E. N. (2014). The introns in FLOWERING LOCUS T-LIKE (FTL) genes are useful markers for tracking paternity in tetraploid *Chenopodium quinoa* Willd. *Genetic Resources and Crop Evolution*, In press.
- Tayalé, A., & Parisod, C. (2013). Natural pathways to polyploidy in plants and consequences for genome reorganization. *Cytogenetic and Genome Research*, 140(2–4), 79–96.
- Uotila, P. (1978). Variation, distribution and taxonomy of *Chenopodium suecicum* and *C. album* in N Europe. *Acta Botanica Fennica*, 108, 1–35.
- Uotila, P. (2001). *Chenopodium* L. In B. Jonsell (Ed.), *Flora Nordica 2* (pp. 4–31). Stockholm: Swedish Royal Academy of Sciences.

- Urquhart, A., Kimpton, C. P., Downes, T. J., & Gill, P. (1994). Variation in Short Tandem Repeat Sequences – a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *International Journal of Legal Medicine*, 107(1), 13–22.
- Van de Peer, Y., Maere, S., & Meyer, A. (2009). The evolutionary significance of ancient genome duplications. *Nature Reviews Genetics*, 10(10), 725–732.
- Varshney, R. K., Graner, A., & Sorrells, M. E. (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*, 23(1), 48–55.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407–4414.
- Wahl, H. A. (1954). A preliminary study of the genus *Chenopodium* in North America. *Bartonia*, 27(1952-1953), 1–46.
- Walsh, P. S., Fildes, N. J., & Reynolds, R. (1996). Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Research*, 24(14), 2807–2812.
- Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*, 38(6), 1358–1370.
- Zozomová-Lihová, J., Krak, K., Mandáková, T., Shimizu, K. K., Španiel, S., Vít, P., & Lysák, M. (2014). Multiple hybridization events in *Cardamine* (Brassicaceae) during the last 150 years: revisiting a textbook example of neoallopolyploidy. *Annals of Botany*, 113(5), 817–30.

Internetové zdroje:

Program FigTree 1.4.2: Available online at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.

Program R: Available online at <http://www.R-project.org/>.

MetaCentrum (CESNET): Available online at <http://www.cesnet.cz/sluzby/metacentrum/>.

8 SEZNAM PŘÍLOH

9.1	PŘÍLOHA Č. 1: Úspěšnost přenosu mikrosatelitových lokusů	104
9.2	PŘÍLOHA Č. 2: Sdílené alely mezi druhy (1).....	106
9.3	PŘÍLOHA Č. 3: Sdílené alely mezi druhy (2).....	107
9.4	PŘÍLOHA Č. 4: Detekování recentní kříženci <i>Ch. album</i>	108
9.5	PŘÍLOHA Č. 5: Analýza výstupu ze STRUCTURE pro lokalitu Praha 7	109
9.6	PŘÍLOHA Č. 6: Analýza výstupu ze STRUCTURE pro lokalitu Podbořany	110
9.7	PŘÍLOHA Č. 7: Analýza výstupu ze STRUCTURE pro lokalitu Velký Rohozec	111
9.8	PŘÍLOHA Č. 8: Analýza výstupu ze STRUCTURE pro lokalitu Hostivice	112
9.9	PŘÍLOHA Č. 9: Analýza výstupu ze STRUCTURE pro lokalitu Vrané nad Vltavou.	113
9.10	PŘÍLOHA Č. 10: PCoA pro studované lokality.....	114

9 PŘÍLOHY

Primární matice mikrosatelitových dat jsou uloženy na CD u předkládané diplomové práce.

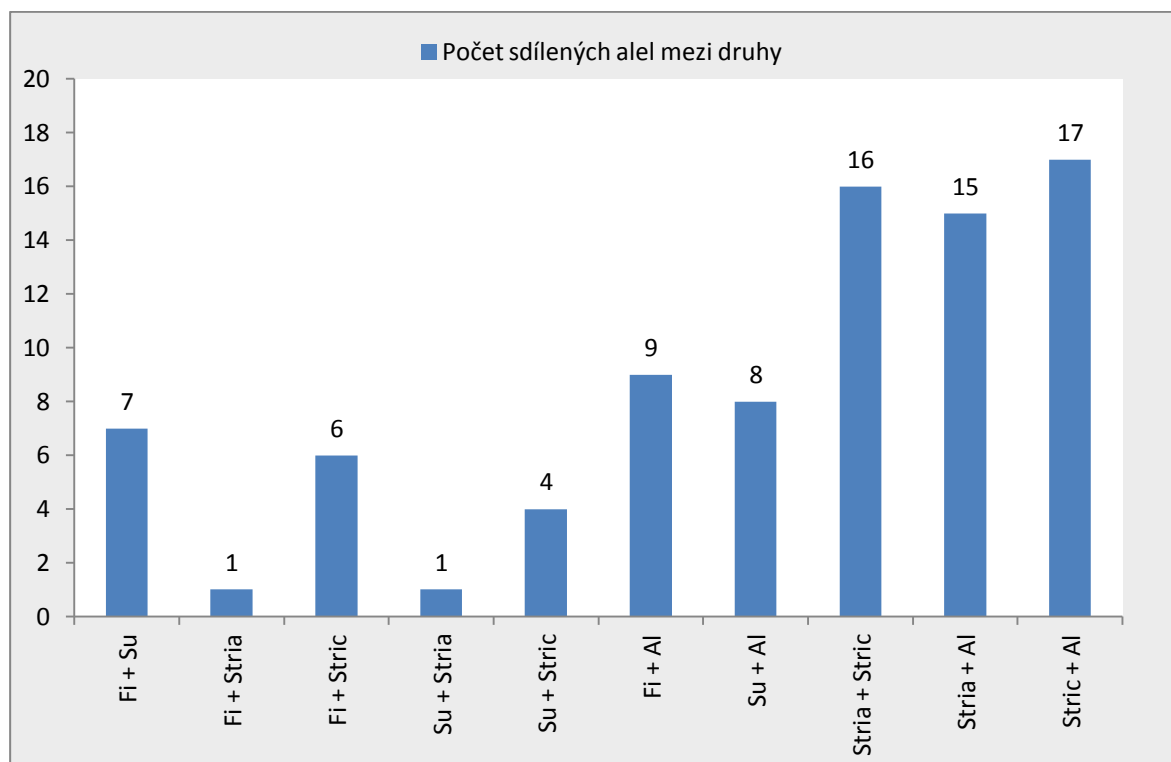
9.1 PŘÍLOHA Č. 1: Úspěšnost přenosu mikrosatelitových lokusů

Tabulka 1 Mikrosatelitové lokusy vybrané na testování z Mason et al. (2005). V tabulce je uveden počet testovaných lokusů, název lokusu a zda se daný lokus podařilo přenést na daný druh (+) či nikoliv (–).

No	Lokus	<i>Ch. ficifolium</i>	<i>Ch. sueticum</i>	<i>Ch. strictum</i>	<i>Ch. striatiforme</i>	<i>Ch. album</i>
1	QCA005	+	–	+	–	+
2	QAAT006	+	+	–	–	–
3	QCA012	+	+	+	+	+
4	QCAA013	+	+	–	+	+
5	QCA015	+	+	+	+	+
6	QGA016	+	+	+	+	+
7	QATG019	+	+	–	–	–
8	QATG029	–	–	–	–	–
9	QAAT029	+	–	+	+	+
10	QAAT040	–	–	+	–	+
11	QAAT046	–	–	–	–	–
12	QCA046	+	+	+	+	+
13	QATG051	+	+	+	–	+
14	QCA053	+	+	+	–	–
15	QCA056	+	+	+	+	+
16	QAAT057	+	–	–	–	–
17	QAAT062	+	–	+	–	–
18	QAAT066	+	+	+	+	+
19	QAAT071	+	–	+	–	–
20	QCA074	+	+	+	+	–
21	QAAT074	+	+	+	–	+
22	QATG081	–	+	+	+	+
23	QAAT088	–	–	+	–	–
24	QAAT096	+	–	–	–	–
25	QCA096	–	–	+	–	–
26	QCA107	+	+	–	–	–
27	QCA108	+	+	+	+	+
28	QCA115	+	+	+	+	+
29	QCA116	+	+	+	+	+
30	QAAT010	+	+	–	–	+
31	QAAT012	+	+	+	+	+
32	QAAT014	+	–	+	+	+
33	QAAT022	–	–	–	–	–
34	QAAT024	–	–	–	–	–
35	QAAT025	+	+	+	+	+

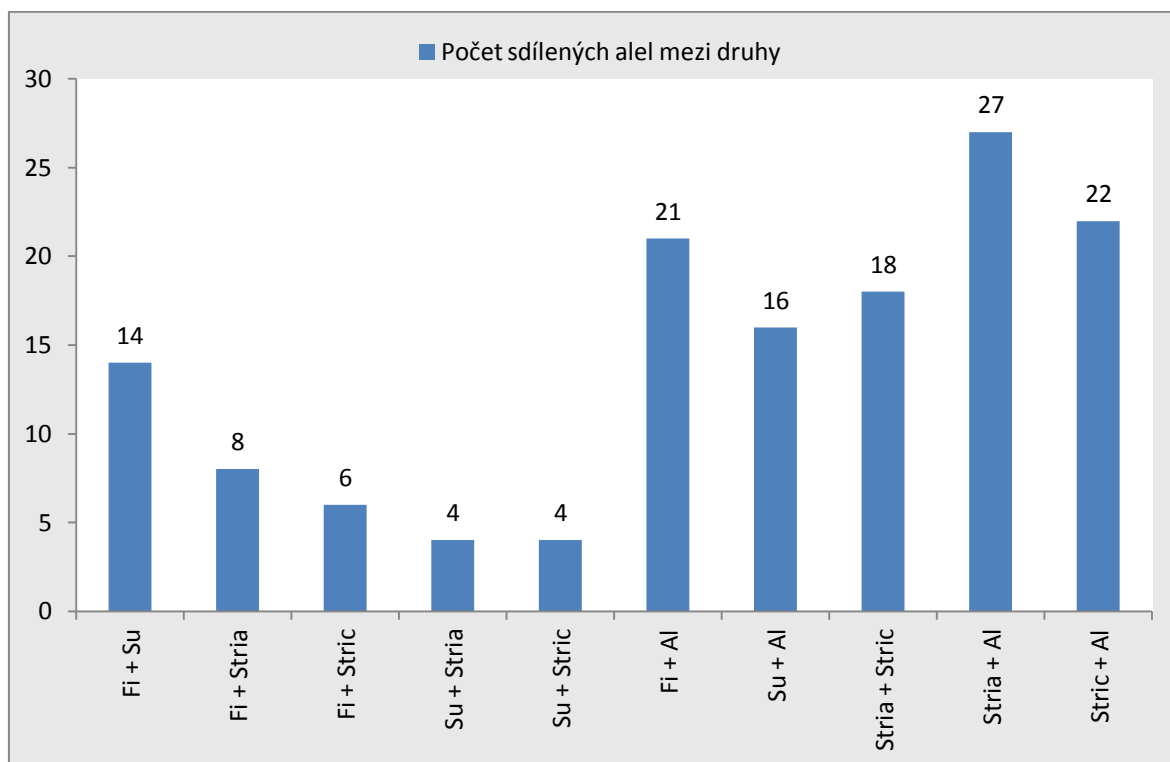
36	QAAT026	–	–	–	–	–
37	QAAT041	+	+	+	+	+
38	QAAT051	–	–	+	–	+
39	QAAT065	+	+	+	+	+
40	QAAT070	+	+	+	–	–
41	QAAT075	–	+	–	–	–
42	QAAT078	+	–	–	–	–
43	QAAT097	–	–	–	+	+
44	QAAT111	–	–	–	–	+
45	QAAT112	–	–	–	+	+
46	QATG001	+	+	–	–	+
47	QATG012	+	+	+	+	+
48	QATG020	+	+	+	–	+
49	QATG026	+	+	+	+	–
50	QATG028	+	–	–	–	–
51	QATG033	–	+	–	–	–
52	QATG035	+	+	+	+	+
53	QATG038	+	+	+	+	+
54	QATG048	+	+	+	+	+
55	QATG059	+	+	+	+	+
56	QATG062	+	+	+	+	+
57	QATG064	+	+	+	+	+
58	QATG069	–	–	–	–	–
59	QATG093	–	+	+	+	+
60	QATG100	–	–	–	–	–
61	QCA013	+	–	–	–	–
62	QCA021	+	+	+	+	+
63	QCA026	+	+	+	+	+
64	QCA027	–	–	–	–	–
65	QCA029	+	+	+	+	+
66	QCA030	+	+	+	+	+
67	QCA034	–	–	–	–	+
68	QAAT087	–	–	–	–	–

9.2 PŘÍLOHA Č. 2: Sdílené alely mezi druhy (1)



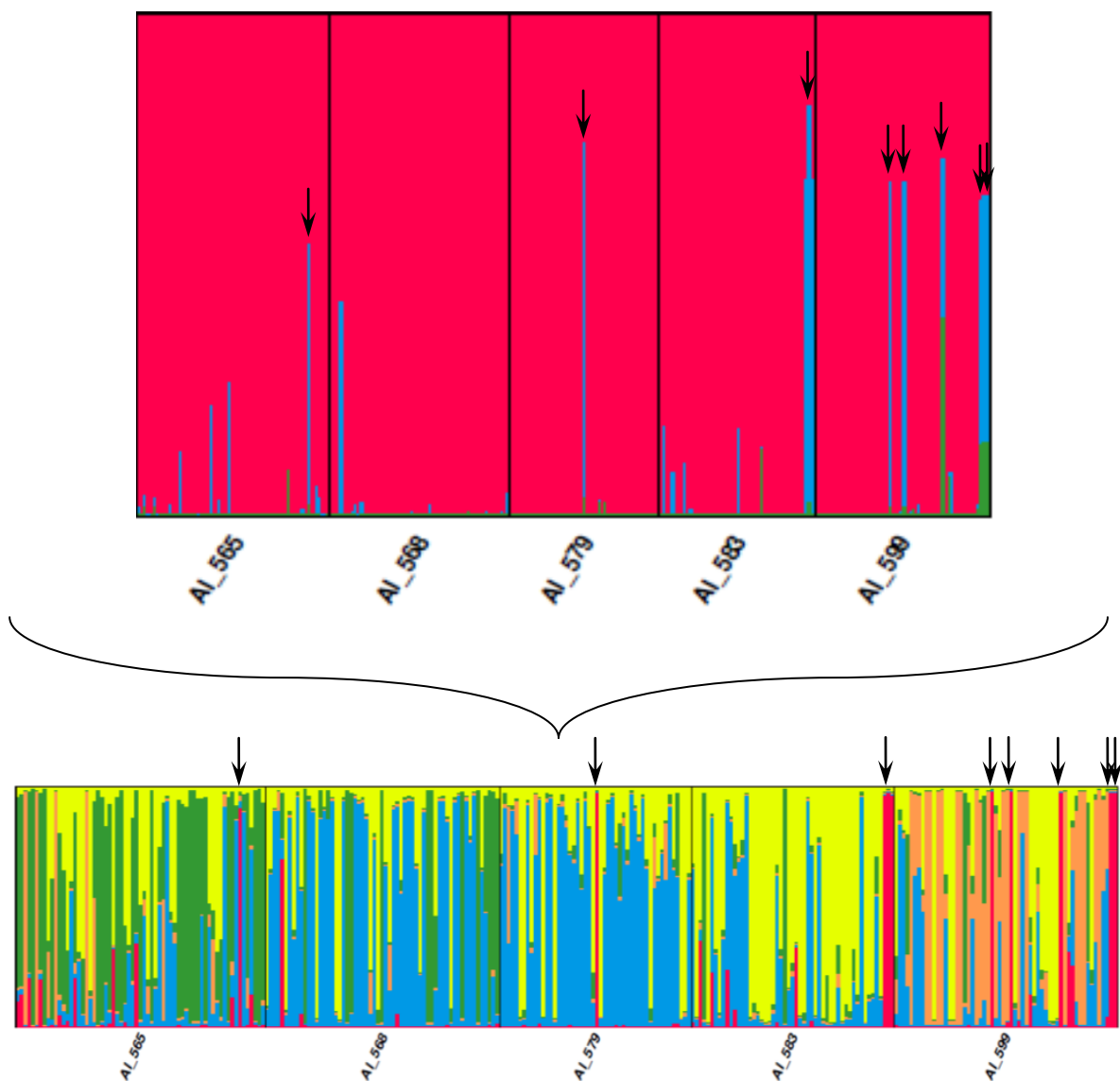
Obrázek 1 Počet detekovaných společných alel v pilotní analýze, znázorněných vždy pro dvojici druhů. Do analýzy bylo zahrnuto 142 jedinců z geograficky vzdálených území (v textu tabulka 3). Pod grafem jsou uvedeny zkratky jednotlivých druhů (Fi – *Ch. ficifolium*, Su – *Ch. suecicum*, Stria – *Ch. striatiforme*, Stric – *Ch. strictum*, Al – *Ch. album*).

9.3 PŘÍLOHA Č. 3: Sdílené alely mezi druhy (2)



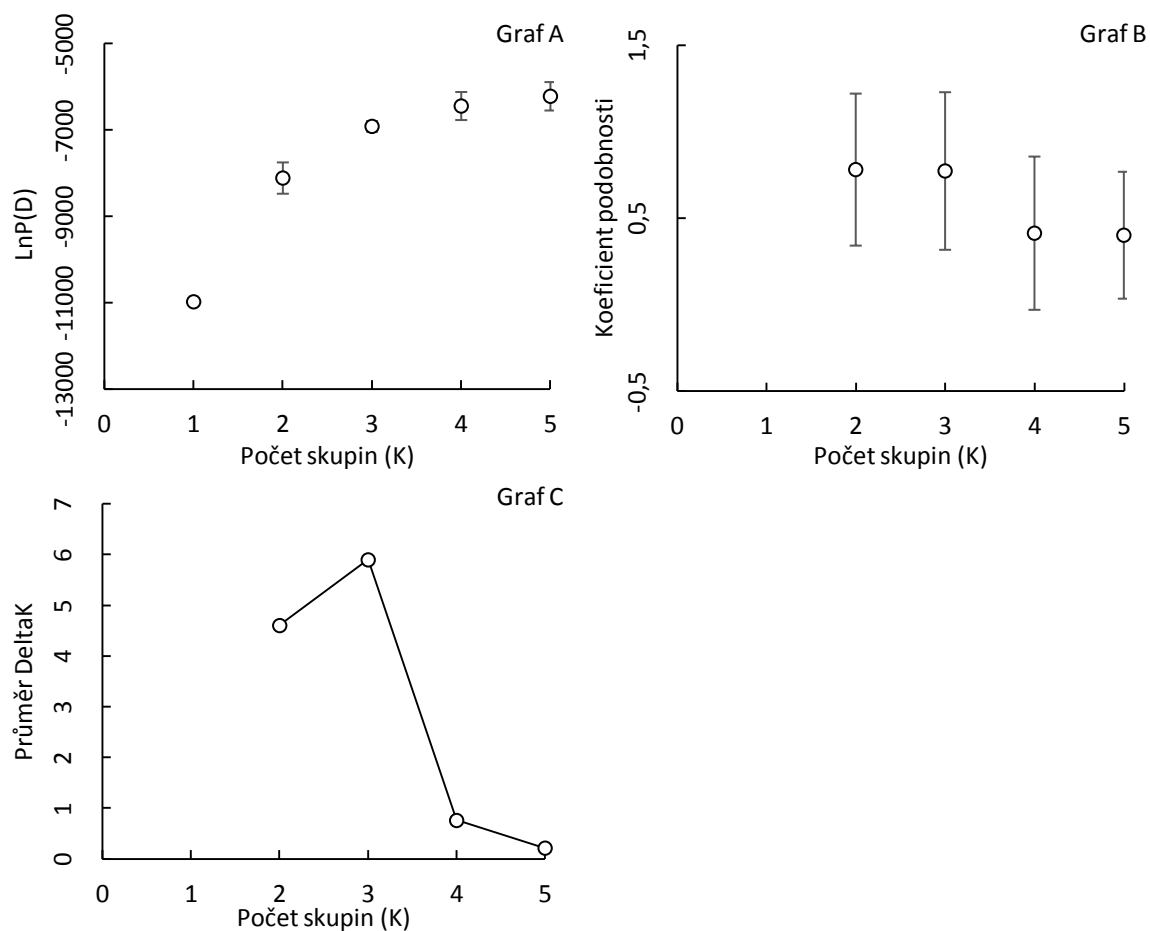
Obrázek 2 Počet detekovaných společných alel jedinců z pěti studovaných lokalit na území ČR, znázorněných vždy pro dvojici druhů. Do analýzy bylo zahrnuto 911 jedinců (v textu tabulka 4). Pod grafem jsou uvedeny zkratky jednotlivých druhů (Fi – *Ch. ficifolium*, Su – *Ch. suecicum*, Stria – *Ch. striatiforme*, Stric – *Ch. strictum*, Al – *Ch. album*).

9.4 PŘÍLOHA Č. 4: Detekování recentní kříženci *Ch. album*



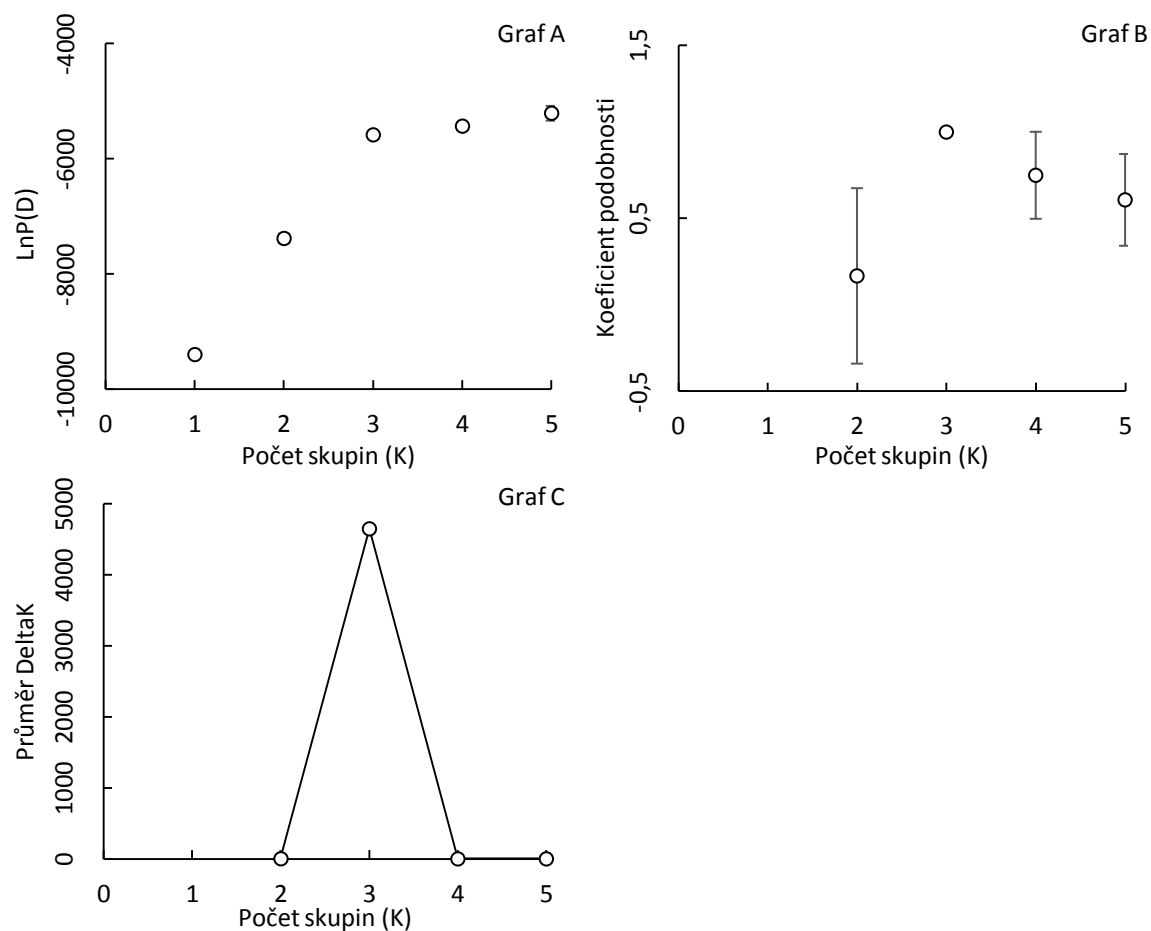
Obrázek 3 Detekce recentně vzniklých hexaploidních jedinců *Ch. album* označených šipkami ve srovnání dvou výstupů z programu STRUCTURE. Horní obrázek ukazuje výřez hexaploidních populací z analýzy pro všechny populace (v textu obrázek 9). Spodní obrázek ukazuje výstup ze STRUCTURE jen pro hexaploidní populace (v textu obrázek 15).

9.5 PŘÍLOHA Č. 5: Analýza výstupu ze STRUCTURE pro lokalitu Praha 7



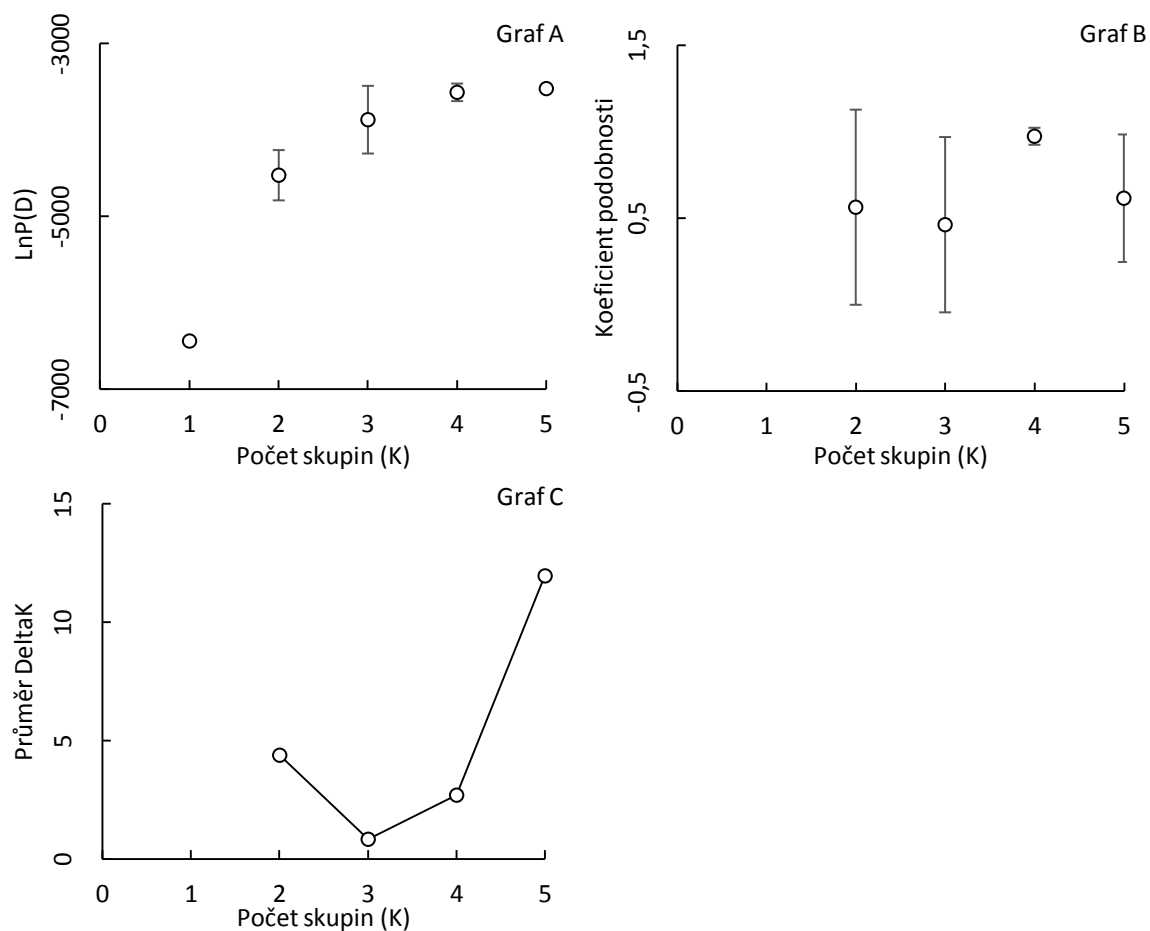
Obrázek 4 Analýza jednotlivých běhů pro lokalitu Praha 7 v programu STRUCTURE vyhodnocená pomocí STRUCTURE-sum-2009. Graf A znázornil pravděpodobnost modelu (LnP(D)), osa y) se vzrůstajícím počtem $K = 1-5$ (osa x). Optimální počet skupin jsou 3 ($K = 3$). Graf B vyjádřil koeficient podobnosti (osa y) mezi jednotlivými běhy pro dané $K = 2-5$ (osa x). Koeficient podobnosti ukázal nejvyšší podobnost pro $K = 2$ a pro $K = 3$. Graf C vyjádřil optimální počet skupin (osa x) pomocí deltaK (osa y) pro dané $K = 2-5$, kde největší podporu má $K = 3$.

9.6 PŘÍLOHA Č. 6: Analýza výstupu ze STRUCTURE pro lokalitu Podbořany



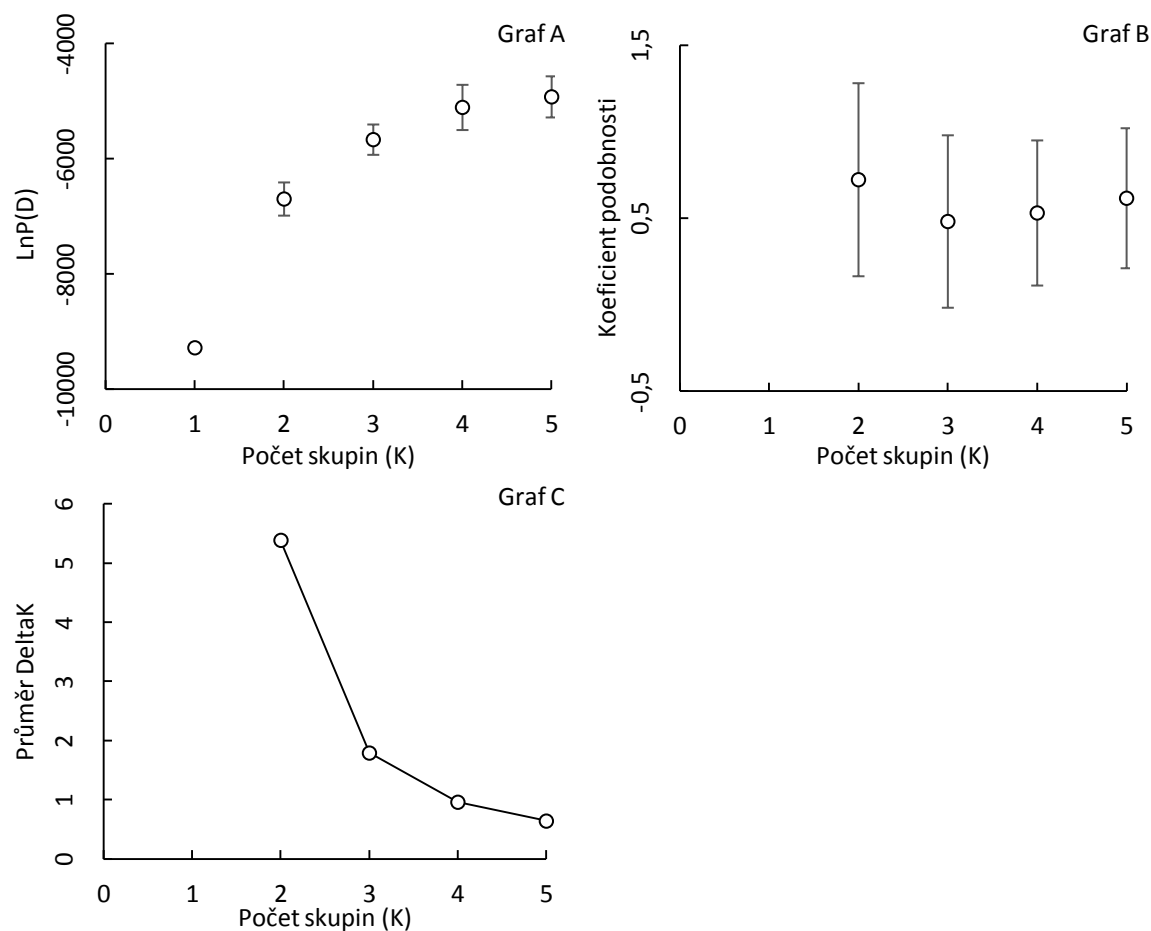
Obrázek 5 Analýza jednotlivých běhů pro lokalitu Podbořany v programu STRUCTURE vyhodnocená pomocí STRUCTURE-sum-2009. Graf A znázornil pravděpodobnost modelu ($\ln P(D)$, osa y) se vzrůstajícím počtem $K = 1-5$ (osa x). Optimální počet skupin jsou 3 ($K = 3$). Graf B vyjádřil koeficient podobnosti (osa y) mezi jednotlivými běhy pro dané $K = 2-5$ (osa x). Koeficient podobnosti ukázal nejvyšší podobnost pro $K = 3$. Graf C vyjádřil optimální počet skupin (osa x) pomocí ΔK (osa y) pro dané $K = 2-5$, kde největší podporu má $K = 3$.

9.7 PŘÍLOHA Č. 7: Analýza výstupu ze STRUCTURE pro lokalitu Velký Rohozec



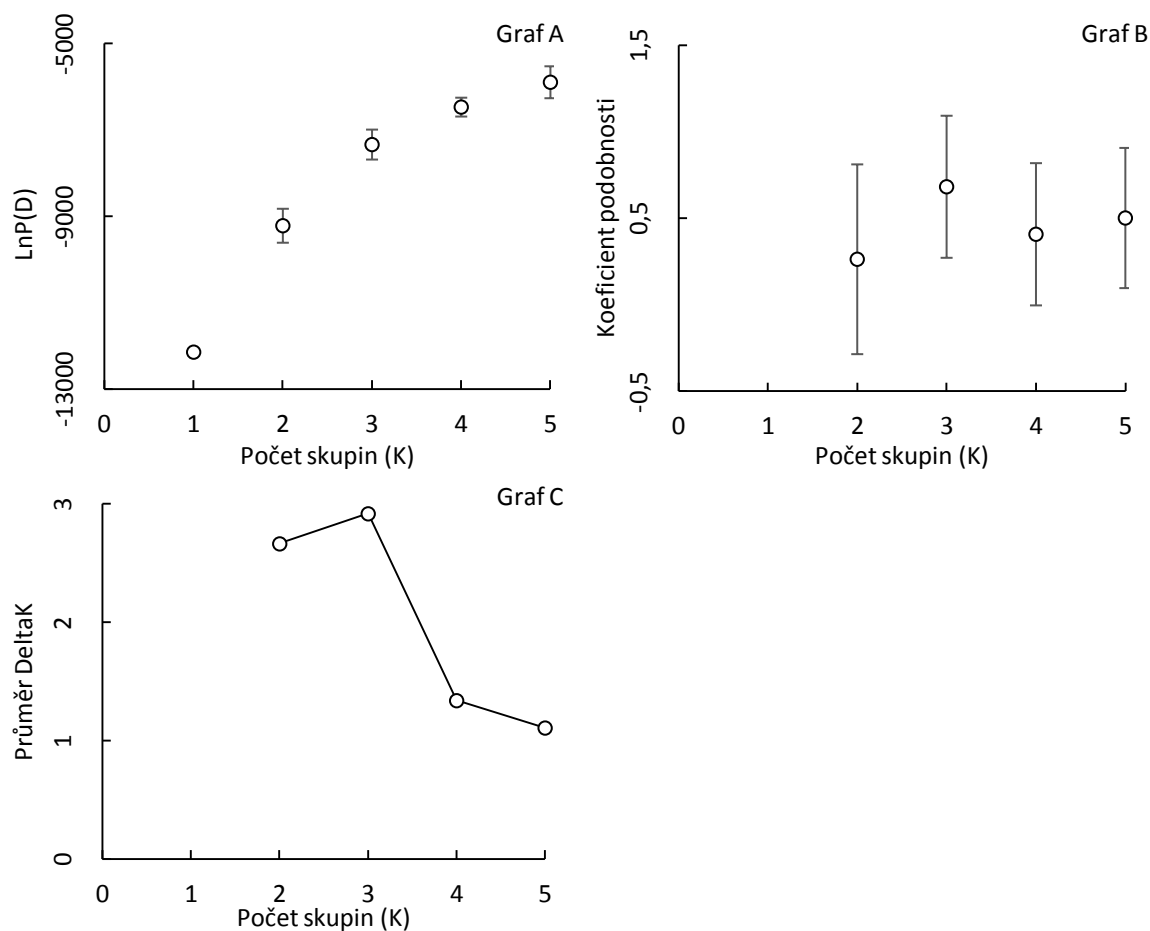
Obrázek 6 Analýza jednotlivých běhů pro lokalitu Velký Rohozec v programu STRUCTURE vyhodnocená pomocí STRUCTURE-sum-2009. Graf A znázornil pravděpodobnost modelu (LnP(D)), osa y) se vzrůstajícím počtem $K = 1-5$ (osa x). Optimální počet skupin jsou 4 ($K = 4$). Graf B vyjadřuje koeficient podobnosti (osa y) mezi jednotlivými běhy pro dané $K = 2-5$ (osa x). Koeficient podobnosti ukázal nejvyšší podobnost pro $K = 4$. Graf C vyjádřil optimální počet skupin (osa x) pomocí deltaK (osa y) pro dané $K = 2-5$, kde největší podporu má zde $K = 5$.

9.8 PŘÍLOHA Č. 8: Analýza výstupu ze STRUCTURE pro lokalitu Hostivice



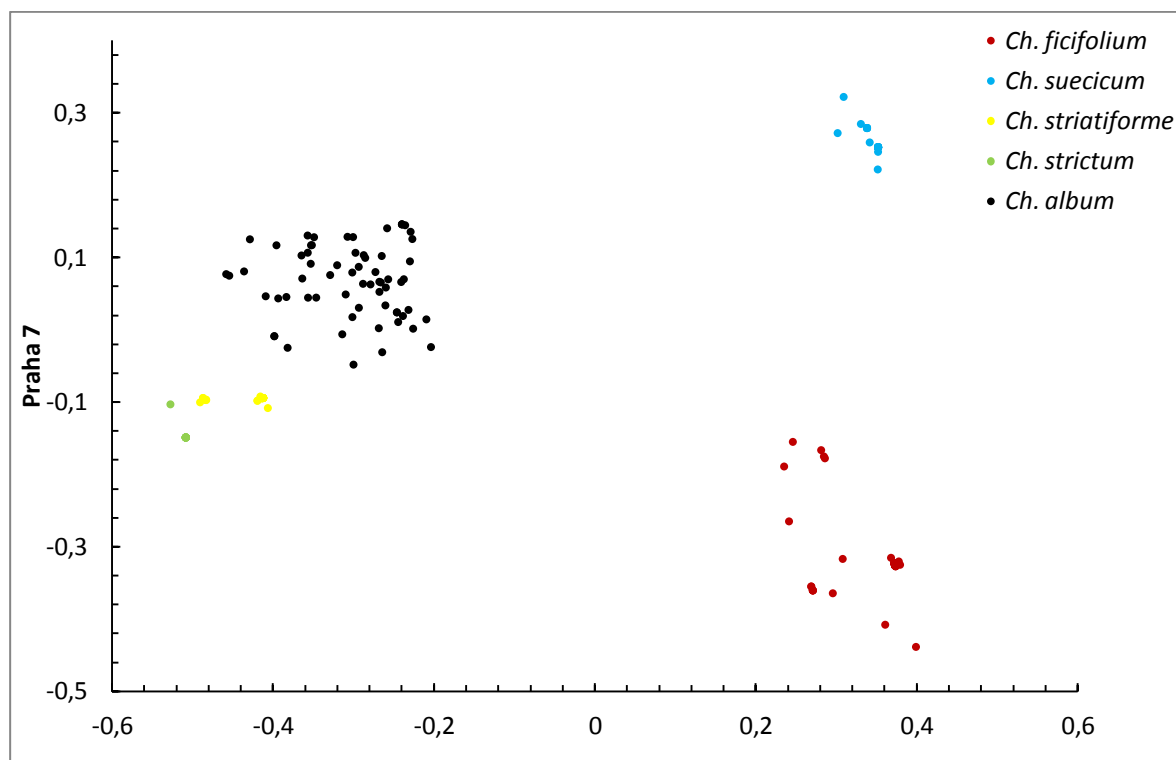
Obrázek 7 Analýza jednotlivých běhů pro lokalitu Hostivice v programu STRUCTURE vyhodnocená pomocí STRUCTURE-sum-2009. Graf A znázornil pravděpodobnost modelu ($\text{LnP}(D)$, osa y) se vzrůstajícím počtem $K = 1-5$ (osa x). Optimální počet skupin zde není jasně daný. Graf B vyjadřuje koeficient podobnosti (osa y) mezi jednotlivými běhy pro dané $K = 2-5$ (osa x). Koeficient podobnosti ukázal nejvyšší podobnost pro $K = 2$. Graf C vyjádřil optimální počet skupin (osa x) pomocí deltaK (osa y) pro dané $K = 2-5$, kde největší podporu má $K = 2$.

9.9 PŘÍLOHA Č. 9: Analýza výstupu ze STRUCTURE pro lokalitu Vrané nad Vltavou

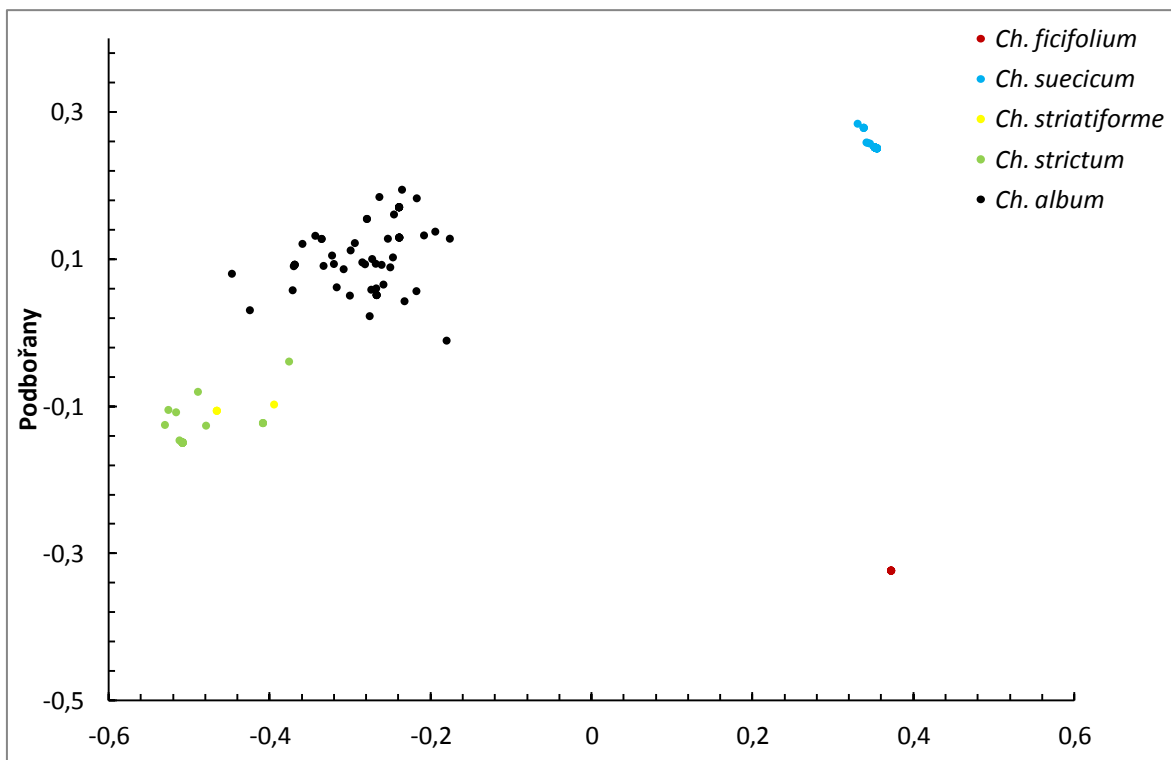


Obrázek 8 Analýza jednotlivých běhů pro lokalitu Vrané nad Vltavou v programu STRUCTURE vyhodnocená pomocí STRUCTURE-sum-2009. Graf A znázornil pravděpodobnost modelu ($\text{LnP}(D)$, osa y) se vzrůstajícím počtem $K = 1-5$ (osa x). Optimální počet skupin zde není jasně daný. Graf B vyjadřuje koeficient podobnosti (osa y) mezi jednotlivými běhy pro dané $K = 2-5$ (osa x). Koeficient podobnosti ukázal nejvyšší podobnost pro $K = 3$. Graf C vyjádřil optimální počet skupin (osa x) pomocí deltaK (osa y) pro dané $K = 2-5$, kde největší podporu má $K = 3$.

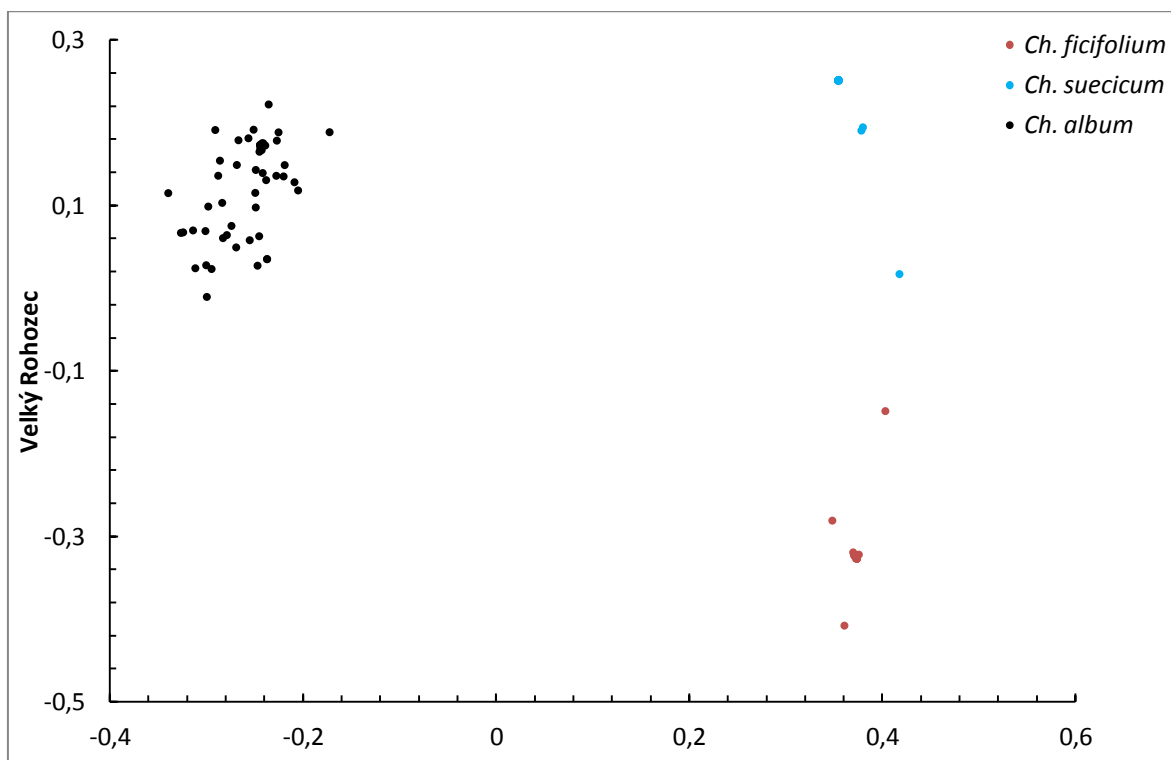
9.10 PŘÍLOHA Č. 10: PCoA pro studované lokality



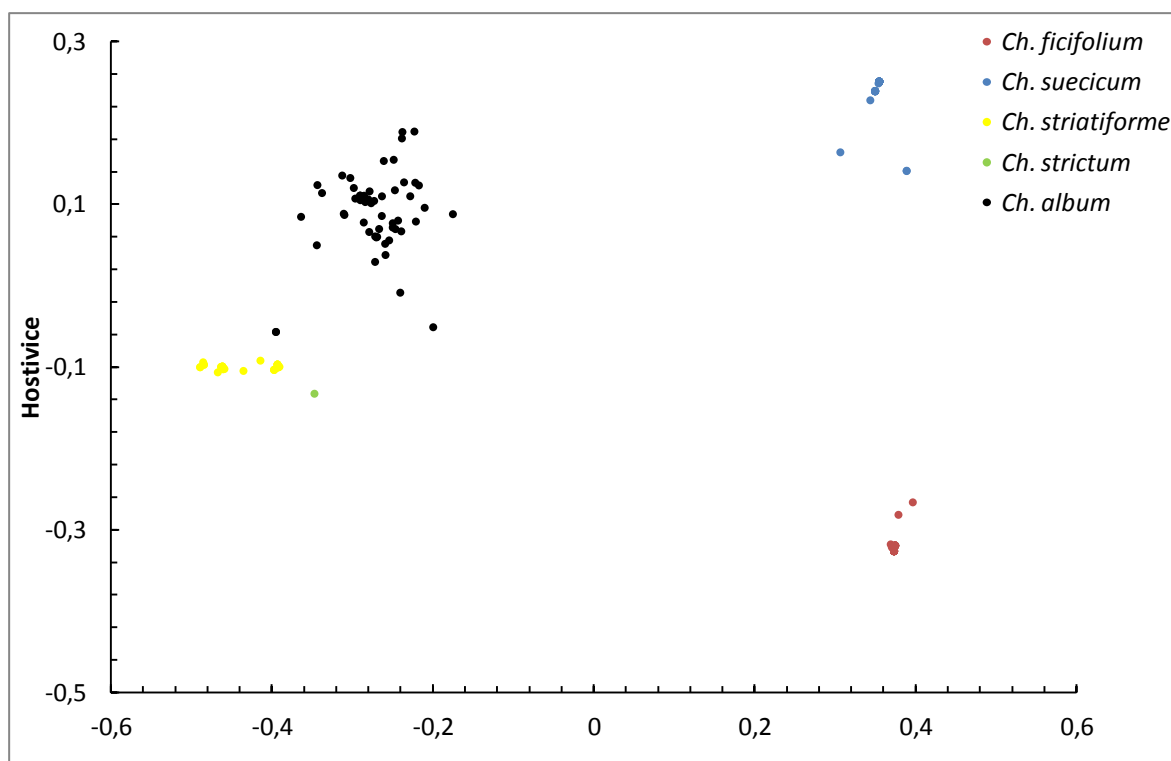
Obrázek 9 Analýza hlavních koordinát (PCoA) jedinců z lokality Praha 7 za použití *Lynch distance* vytvořenou pomocí R skriptu POLYSAT. Na grafu můžeme vidět rozdělení jedinců do skupin podle druhové příslušnosti. Také je zde patrná velká vzdálenost mezi diploidními druhy *Ch. ficifolium*, *Ch. suecicum* a polyploidními druhy *Ch. striatiforme*, *Ch. strictum* a *Ch. album*. Tetraploidní druhy byly zde umístěny těsně u sebe. Vodorovná osa vysvětlila 58,02 % variability a svislá osa 21,6 % variability.



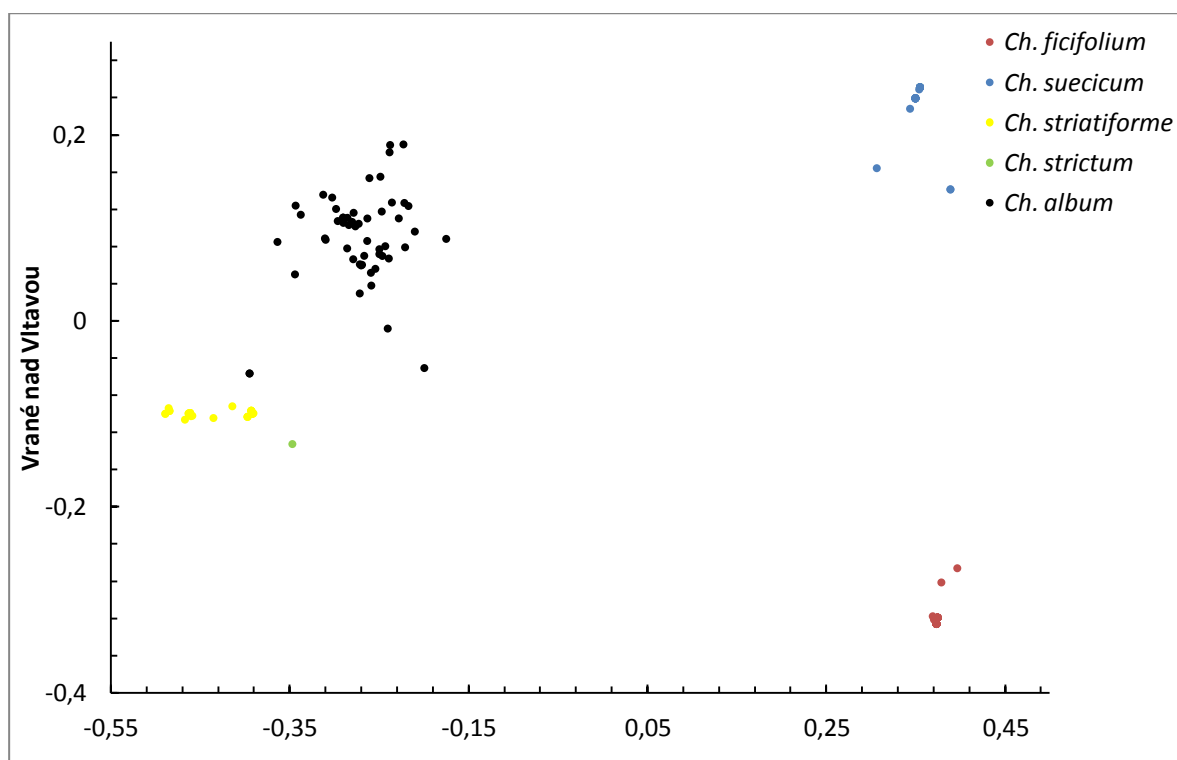
Obrázek 10 Analýza hlavních koordinát (PCoA) jedinců z lokality Podbořany za použití *Lynch distance* vytvořenou pomocí R skriptu POLYSAT. Na grafu můžeme vidět rozdělení jedinců do skupin podle druhové příslušnosti. Vodorovná osa vysvětlila 58,02 % variability a svislá osa 21,6 % variability.



Obrázek 11 Analýza hlavních koordinát (PCoA) jedinců z lokality Velký Rohozec za použití *Lynch distance* vytvořenou pomocí R skriptu POLYSAT. Na grafu můžeme vidět rozdělení jedinců do skupin podle druhové příslušnosti. Vodorovná osa vysvětlila 58,02 % variability a svislá osa 21,6 % variability.



Obrázek 12 Analýza hlavních koordinát (PCoA) jedinců z lokality Hostivice za použití *Lynch distance* vytvořenou pomocí R skriptu POLYSAT. Na grafu můžeme vidět rozdělení jedinců do skupin podle druhové příslušnosti. Vodorovná osa vysvětlila 58,02 % variability a svislá osa 21,6 % variability.



Obrázek 13 Analýza hlavních koordinát (PCoA) jedinců z lokality Vrané nad Vltavou za použití *Lynch distance* vytvořenou pomocí R skriptu POLYSAT. Na grafu můžeme vidět rozdělení jedinců do skupin podle druhové příslušnosti. Vodorovná osa vysvětlila 58,02 % variability a svislá osa 21,6 % variability.